Aus dem Institut für Tierzucht und Tierernährung

der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. Kurt Bronsch

---

# ZUR FRAGE DER BETEILIGUNG VON BICARBONATIONEN DES BLUTPLASMAS BEI DER EISCHALENMINERALISATION

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung

des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt

von

Christian Zscheile

Tierarzt aus Dresden

Berlin 1969

Journal Nr. 645

Aus dem Institut für Tierzucht und Tierernährung

der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. Kurt Bronsch

---

# ZUR FRAGE DER BETEILIGUNG VON BICARBONATIONEN DES BLUTPLASMAS BEI DER EISCHALENMINERALISATION

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung

des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt

von

Christian Zscheile

Tierarzt aus Dresden

Berlin 1969

Journal Nr. 645

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. K. Bronsch

Referent: Prof. Dr. K. Bronsch

Korreferent: Prof. Dr. H. Hartwigk

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 2. 1969

UNIV. LEIDEN BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS


| | Seite |
|---|---|
| I. EINLEITUNG | 1 |
| II. LITERATUR | 2 |
| 1. Bildung der Eischalenmatrix und Bereitstellung von Calciumionen am Ort der Mineralisation | 2 |
| 2. Die Bildung und Sekretion der Bicarbonat- und Carbonationen in der Schalendrüse | 3 |
| 3. Das Bicarbonat, der $CO_2$-Transport und die Atmungsfunktion des Blutes | 9 |
| Eigene Untersuchungen | |
| III. ARBEITSPLAN | 12 |
| IV. TIERMATERIAL UND METHODIK | 14 |
| A. Versuchstiere | 14 |
| B. Durchführung der Versuche | 15 |
| I) Messung der $C^{14}O_2$- und $CO_2$-Exhalationsraten nach intramuskulärer Applikation von $C^{14}$-Bicarbonat in Abhängigkeit vom Funktionszustand der Schalendrüse | 15 |
| 1. Anzahl der Versuche | 15 |
| 2. Versuchsanordnung - Arbeitsgang | 16 |
| a. Anlegen der Atemhaube | 16 |
| b. Dosierung des $C^{14}$-markierten Natriumbicarbonats | 16 |
| 3. Meßtechnik | 17 |
| a. Beschreibung und Arbeitsweise des Exhalationsmeßgerätes FHT 50 A | 17 |
| b. Methode zur Bestimmung einer Bezugsgröße | 19 |
| II) Ermittlung der $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Einbaurate in die Eischale bei konstanter $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Aktivität im Blut | 20 |
| 1. Anzahl der Versuche | 20 |
| 2. Versuchsanordnung - Arbeitsgang | 20 |
| a. Kanülierung der Flügelvenen | 20 |
| b. Dauerinfusion der Nuklide | 21 |

Seite

3. Meßtechnik - Analytik 22

a. Kontrolle der konstanten $C^{14}$-Bicarbonat-aktivität im Blut 22

b. Kontrolle der konstanten $Ca^{47}$-Aktivität im Blut 22

c. Aufarbeitung der Blutproben und Messung der darin enthaltenen $Ca^{47}$- und/oder $C^{14}$-Aktivität 24

d. Aufarbeitung der Eischale und Messung der in ihr enthaltenen $Ca^{47}$- und/oder $C^{14}$-Aktivität 27

V. ERGEBNISSE 29

1. Die $C^{14}O_2$- und $CO_2$-Exhalationsraten in Abhängigkeit vom Funktionsstadium der Schalendrüse 29

2. Die $Ca^{47}$-Einbaurate in die teilmineralisierte Eischale bei konstant gehaltener $Ca^{47}$-Aktivität im Blut 35

3. Die $C^{14}$-Einbaurate in die teilmineralisierte Eischale bei konstant gehaltener $C^{14}$-Aktivität im Blut 38

4. Die Einbauraten von $Ca^{47}$ und $C^{14}$ in die Eischale bei konstant gehaltener Aktivität beider Nuklide im Blut (Doppelmarkierung) 40

VI. DISKUSSION 43

1. Diskussion der in Abhängigkeit vom Funktionszustand der Schalendrüse ermittelten $C^{14}O_2$- und $CO_2$-Exhalationsraten 43

2. Diskussion der Einbauraten von $Ca^{47}$ und $C^{14}$ in die teilmineralisierte Eischale 45

a. Zur Methodik 45

b. Zu den Ergebnissen 46

VII. ZUSAMMENFASSUNG 49

VIII. LITERATURVERZEICHNIS 52

# I. EINLEITUNG

Die Ursachen der vorwiegend bei weißschaligen Eiern von Hybridlegerassen beobachteten mangelhaften Eischalenstabilität aufzufinden und abzustellen, setzt genaue Kenntnisse über die während der Eischalenmineralisation ablaufenden Prozesse im Calcium- und Bicarbonatstoffwechsel voraus. Während über die Herkunft des Calciums und dessen Einbau in die hauptsächlich aus Calciumcarbonat bestehende Eischale eine Reihe experimenteller Daten vorliegen, beschränkt sich unser Wissen über den Ursprung, die Sekretion und Formation des Carbonats der Eischale auf Hypothesen, die kaum oder noch nicht experimentell untermauert sind.

Herr Professor Dr. K. BRONSCH hat mir daher die Aufgabe gestellt, das Ausmaß der pulmonalen Elimination von $C^{14}$-markiertem Blutbicarbonat in Abhängigkeit vom Funktionszustand der Schalendrüse zu bestimmen sowie experimentell unter Zuhilfenahme der beiden radioaktiven Indikatoren - $C^{14}$-Bicarbonat und Calcium-47 - zu prüfen, ob und in welchem Umfange das Bicarbonat des Blutes an der Eischalenmineralisation beteiligt ist.

# II. LITERATUR

In diesem Kapitel sollen die heute zur Diskussion stehenden Ansichten über die Mineralisation der Eischale bei Legehennen skizziert und zur Interpretation einiger experimenteller Befunde Stellung genommen werden.

Nach einem kurzen Überblick über die Absonderung und Strukturierung des organischen Materials der Eischale sowie die Herkunft und Bereitstellung des für die Eischalenbildung erforderlichen Calciums werden im Hauptteil dieses Kapitels die in Zusammenhang mit der Carbonatbildung in der Schalendrüse stehenden Probleme aufgezeigt. Um Interaktionen zwischen der Bildung des Eischalencarbonats und dem Bicarbonatstoffwechsel im Blut zu verdeutlichen, werden abschließend einige kurze Ausführungen über die Atmungsfunktion und den $CO_2$-Transport des Blutes gemacht.

## 1. Bildung der Eischalenmatrix und Bereitstellung von Calciumionen am Ort der Mineralisation

Beim Eintritt in die Schalendrüse ist das Ei bereits von zwei Hüllen (innere und äußere Membran) umgeben und wird zunächst mit einer weiteren Doppelschicht, den Mammillen und der Matrix (Spongiosa) versehen. Diese bestehen beide hauptsächlich aus Proteinen und sauren Mucopolysacchariden (STEWART, 1935; ROMANOFF und ROMANOFF, 1949). Letztere übernehmen die Rolle der Calcium-Anreicherung in der Eischalenmatrix (RUBIN und Mitarb., 1950; SOBEL und BURGER, 1954; SIMKISS und TYLER, 1957). -

In die präformierte, feinfasrig-vernetzte Matrix wird schließlich die anorganische Substanz eingelagert, die zu 98,43 % aus kristallisiertem Calciumcarbonat - Calcit in sphäritischer Form (SCHMIDT, 1962,

1966) - 0,84 % Magnesiumcarbonat und 0,73 % Tricalciumphosphat besteht. - Die lokale Anreicherung der Kationen oder Anionen und eine damit einhergehende Konzentrationserhöhung der betreffenden Ionen soll durch Überschreiten des Löslichkeitsproduktes die Ausfällung des jeweiligen Salzes herbeiführen. -

Die Mineralisation der Eischale dauert etwa 17 - 20 Stunden (WARREN und SCOTT, 1935). In diesem Zeitraum werden durchschnittlich 5 g $CaCO_3$ in die Eischale eingelagert. Das entspricht pro Ei einer Menge von 2 g Calcium und 3 g Carbonat. -
Das für die Eischalenbildung erforderliche Calcium wird durch das Blut bereitgestellt, dessen Calciumkonzentration im Plasma etwa 26,6 mg % beträgt, wobei auf proteingebundenes Calcium 20 mg %, auf ionogenes 6 mg % und auf komplexgebundenes Calcium etwa 0,6 mg % entfallen (McLEAN und HASTINGS, 1935). - Während der Eischalenmineralisation entzieht die Schalendrüse dem Blut kontinuierlich Calcium, das jedoch ständig durch mobilisiertes Skelettcalcium bzw. resorbiertes Nahrungscalcium wieder ersetzt wird, so daß der Calciumgehalt des Blutes nahezu konstant bleibt.

## 2. Die Bildung und Sekretion der Bicarbonat- und Carbonationen in der Schalendrüse

Für die Eischalenbildung ist am Orte der Mineralisationsprozesse außer der Sekretion von organischer Grundsubstanz und Calcium eine ausreichende Bereitstellung von Bicarbonat- bzw. Carbonationen nötig.-
Von physiologischem Interesse ist nun die Beantwortung folgender Fragen:

Woher kommt das Bicarbonat bzw. Carbonat?
Wie gelangt es in die Schalendrüse und wie ins Uterussekret bzw. in die Eischale?

In den wenigen uns zur Verfügung stehenden Publikationen über den Bicarbonatstoffwechsel in der Schalendrüse sind mehrere Hypothesen postuliert worden. Es gibt eine Reihe variierender Ansichten sowie Modellvorstellungen über die Entstehung und Sekretion der Carbonationen im Zusammenhang mit der Eischalenmineralisation. Eine direkte experimentelle Untermauerung der vermuteten Reaktionsmechanismen ist jedoch bislang noch nicht gelungen. -

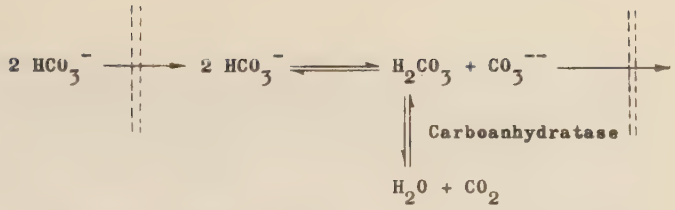
MELDRUM und ROUGHTON untersuchten 1934 die Eigenschaften und einige Angriffspunkte des von ROUGHTON 1932 entdeckten zinkhaltigen Fermentes Carboanhydratase, das die Reaktion

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

katalysiert. Der hohe Carbonatanteil in der Eischale des Geflügels bestärkte sie in der Vermutung, daß die Carboanhydratase möglicherweise auch bei der Eischalenverkalkung eine große Rolle spielt. COMMON (1941) konnte nachweisen, daß der Uterus und das Oviduct von Legehennen tatsächlich Carboanhydratase beherbergen.

MANN und KEILIN (1940) beobachteten, daß bestimmte Sulfonamide, z. B. das Sulphanilamid, in der Lage sind, die Enzymaktivität der Carboanhydratase zu hemmen. Von dieser Beobachtung ausgehend verfütterten BENESCH und Mitarbeiter (1944) Sulfonamidabkömmlinge an Legehennen mit dem Ergebnis, daß die Hennen einige Stunden post applikationem dunnschalige, mangelhaft verkalkte Eier legten. Die Hemmung der Carboanhydratase führte also zu einer Blockade der Mineralisation der Eischale.

GUTOWSKA und MITCHELL (1945) haben im Anschluß an eine Studie über die Carboanhydratase im Uterus des Huhnes die Vermutung geäußert, daß die Carbonate der Eischale aus dem Bicarbonat des Blutes gebildet werden. Nach ihren Vorstellungen werden 2 Moleküle Bicarbonat, die aus dem Blut stammen, in den Uteruszellen zu Kohlensäure und Carbonationen disproportioniert. Die gebildeten Carbonationen sollen dann ins Uteruslumen sezerniert werden:




Eine permanente Carbonationen-Produktion und -Sekretion während des Mineralisationsprozesses wird durch das im Uterus lokalisierte Enzym Carboanhydratase ermöglicht, das fortlaufend die Dehydratation der gebildeten Kohlensäure zu $H_2O + CO_2$ katalysiert.

SIMKISS (1961) hingegen vertritt die Auffassung, daß die Bicarbonationen nicht aus dem Blut stammen, sondern unmittelbar in den Uteruszellen gebildet werden. Der Autor nimmt an, daß unter Einfluß der Carboanhydratase das in den Uteruszellen anfallende Stoffwechselendprodukt $CO_2$ zu Kohlensäure hydratisiert wird, welche zunächst in ein Bicarbonation und ein Proton dissoziiert:

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Unter nochmaliger Abspaltung eines Protons soll jeweils ein Bicarbonation in ein Carbonation übergeführt und dieses dann ins Uteruslumen sezerniert werden:

$$HCO_3^- \rightleftharpoons H^+ + CO_3^{--}$$

Der Autor betrachtet den in den Uteruszellen gemessenen (DICULESCO, 1961) niedrigen pH-Wert von 5,8 als Folge der mehrstufigen Dissoziation der Kohlensäure in den Uteruszellen.
DIAMANTSTEIN (1966) stimmt der SIMKISS'schen Theorie im Prinzip zu. Jedoch vertritt er die Annahme, daß die Bildung der Carbonationen

durch Spaltung der Bicarbonationen in Protonen und Carbonationen nicht in den Uteruszellen, sondern erst im Uteruslumen erfolgt. Seiner Ansicht nach werden also nicht Carbonationen, sondern Bicarbonationen ins Uteruslumen sezerniert. Für diesen Vorgang sprechen:

a. der niedrige pH-Wert von 5,8 in den Uteruszellen (DICULESCO, 1961), der dort eine Dissoziation der Bicarbonationen in Protonen und Carbonationen aufgrund der kleinen Dissoziationskonstante des Bicarbonats unmöglich macht;

b. die Beobachtung, daß auch andere Drusen, wie z. B. die Gld. parotis des Rindes (DIAMANTSTEIN, 1966; DIAMANTSTEIN und SCHLUNS, 1964), Bicarbonationen sekretieren. Da die Carboanhydratase in den Drusenzellen der Speicheldrusen ähnlich wie in den kubischen Epithelien der Uterusdrüsen lokalisiert ist, scheint es naheliegend, daß auch die Schalendrüse Bicarbonationen sekretiert.
In diesem Zusammenhang ist eine Arbeit neueren Datums von Interesse (LEDER und TRITSCHLER, 1966), in der die Lokalisation der Carboanhydratase in den bicarbonationensekretierenden Speicheldrusen (Parotis, Sublingualis) von Ratten, Mäusen und Katzen mit dem histochemischen Carboanhydratase-Test von HAUSLER (1958) untersucht wurde. Die Autoren beobachteten u. a., daß die Carboanhydratase in den Epithelien der acino-tubulosen Drusen der Glandula sublingualis der Katze lumenwarts lokalisiert ist - ähnlich wie in den kubischen Epithelien der tubulosen Uterusdrüsen des Geflügels.

Diese histochemische Übereinstimmung in der intracellulären Carboanhydratase-Lokalisation konnte als Ausdruck funktioneller Analogien gedeutet werden.

Wenn ins Uteruslumen Bicarbonationen sekretiert und davon noch kontinuierlich Protonen abdissoziiert werden, müßte, da der pH-Wert des Uterussekretes von 7,8 im alkalischen Bereich liegt, laufend für die Elimination der Protonen gesorgt werden. Wie der dafür er-

forderliche $H^+$-Ionen-Eliminationsmechanismus funktioniert, entzieht sich unserer Kenntnis und bedarf experimenteller Untersuchungen. Denkbar wäre der Entzug der $H^+$-Ionen aus dem Uterussekret durch folgende Prozesse:

a. Diffusion der $H^+$-Ionen in die Blutkapillaren des Uterus, wo sie u. U. durch eine lokale Erniedrigung des pH-Wertes die saure Dissoziation der Proteinvehikel des proteingebundenen Calciums zurückdrängen, so daß Calciumionen frei werden, die aus dem Blut über die Drüsenzellen ins Uterussekret gelangen;

b. Bindung der $H^+$-Ionen durch disulfidhaltige Proteine des Uterussekretes, die als Protonenakzeptoren wirken, wobei jeweils eine Disulfidgruppe zu zwei Sulfhydrilgruppen reduziert wird. -

MONGIN und LACASSAGNE (1966 a) untersuchten das Säure-Basen-Gleichgewicht des Blutes während der Eischalenmineralisation. Sie prüften an 8 Legehennen die Schwankungen des pH-Wertes und des $CO_2$-Partialdruckes im venösen Blut. Der jeweils gemessene pH-Wert und $CO_2$-Partialdruck ($pCO_2$) dienten ferner der Berechnung der $HCO_3^-$-Ionenkonzentration im venösen Blut. Die Berechnung erfolgte nach der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung:

$$pH = pK' + \log \frac{HCO_3^-}{\alpha \cdot pCO_2}$$

wobei $\alpha$ die Lösungskonstante des $CO_2$ in $H_2O$ und pK' die Dissoziationskonstante darstellen.
Die Untersuchungen führten zu folgenden Resultaten:

a. Der pH-Wert des venösen Blutes ist etwa bis zur 5. Stunde nach der letzten Eiablage geringfügig erhöht (Alkalose). Bis zu diesem Zeitpunkt befindet sich das nächste Ei noch im Magnum oder Isthmus. Danach gelangt es in den Uterus und der pH-Wert beginnt

langsam zu sinken. Zwischen der 10. und 22. Stunde nach der letzten Eiablage - wenn das Ei in der Schalendrüse mineralisiert wird - sinkt der pH-Wert von 7,52 auf 7,41 (22. Std.) und erreicht zum Ablegezeitpunkt des 2. Eis nahezu wieder seine ursprüngliche Höhe.

b. Die nach der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung berechnete Bicarbonationen-Konzentration verhält sich während der Eischalenmineralisation ähnlich wie der pH-Wert. 22 Stunden nach der letzten Eiablage ist sie maximal um 30 % gesunken und beträgt etwa 20,7 mVal/ Danach steigt sie wieder an und erreicht bei Ablage des 2. Eis ihren Ausgangswert (29,6 mVal/l).

Um sicherzustellen, daß diese Variationen im Säure-Basen-Gleichgewicht des Blutes auch tatsächlich von der Eischalenbildung abhängig sind und nicht etwa zyklische, von der Eischalenmineralisation unabhängige Tagesschwankungen darstellen, wurde in einem Parallelversuch das Säure-Basen-Gleichgewicht auch bei 3 Hähnchen unter den gleichen Versuchsbedingungen geprüft. In keinem Augenblick des Tages haben sich der pH-Wert, der $CO_2$-Partialdruck und somit die Bicarbonatkonzentration des venösen Blutes beim Hahn signifikant verändert. -

Aus dem Verhalten des pH-Wertes und des $CO_2$-Partialdruckes im venösen Blut sowie der daraus errechneten Bicarbonatkonzentration schließen MONGIN und LACASSAGNE auf einen Entzug von Bicarbonationen aus dem Blut durch den Uterus während der Eischalenbildung. Damit stimmen diese Autoren der Theorie von GUTOWSKA und MITCHELL (1945) zu.

Die experimentellen Daten von MONGIN und LACASSAGNE können aber auch auf andere Weise gedeutet werden. So wäre es z. B. denkbar, daß die gemessene Erniedrigung des pH-Wertes des Blutes durch Protonenabspaltung von der $H_2CO_3$ bzw. vom Bicarbonat (vgl. Theorie von SIMKISS und DIAMANTSTEIN) zustandekommt. Die zunächst in den Uteruszellen

angereicherten Protonen diffundieren in die Blutkapillaren und bewirken somit eine metabolische Acidose, deren Kompensation durch eine vermehrte Abatmung von $CO_2$ - durch Hyperventilation - möglich ist, wobei eine Verminderung des Standardbicarbonates des Blutes festgestellt wird (ROSSIER und Mitarb., 1958). Die beobachtete Hyperventilation bei Legehennen während der Eischalenmineralisation haben MONGIN und LACASSAGNE (1966 b) als Folge einer metabolischen Acidose gedeutet, die teilweise kompensiert wird. Die Autoren führen die Acidose auf den Entzug von Bicarbonationen aus dem Blut durch den Uterus zurück. -
Um Klarheit darüber zu gewinnen, ob dem Blut beim Durchströmen des Uterus während der Eischalenmineralisation Bicarbonationen entzogen werden oder nicht, ermittelten HODGES und LÖRCHER (1967) die arterio-venöse Differenz von intravenös injiziertem $C^{14}$-markierten Na-Bicarbonat an 10 Legehennen in Abhängigkeit vom Funktionszustand der Schalendrüse.

Ergebnis dieser Untersuchung: Die arterio-venösen $C^{14}$-Differenzen zwischen Hennen während der Eischalenverkalkung und solchen ohne Ei im Uterus zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die anschließende Untersuchung der Eischalen ergab, daß nur 1 - 3 % der als $C^{14}$-Bicarbonat i. v. verabreichten $C^{14}$-Menge während der 2-stündigen Versuchszeit in die teilmineralisierte Eischale eingebaut worden waren.

Diese Befunde sind nicht in Einklang zu bringen mit der von GUTOWSKA und MITCHELL (1945) aufgestellten Theorie, wonach Bicarbonationen während der Eischalenmineralisation aus dem Blut in die Uteruszellen diffundieren.

## 3. Das Bicarbonat, der $CO_2$-Transport und die Atmungsfunktion des Blutes

In diesem Abschnitt soll ein kurzer Uberblick über den Bicarbonat-

haushalt und den $CO_2$-Transport des Blutes gegeben werden, soweit er im Rahmen dieser Arbeit von Interesse ist.

Unter normalen physiologischen Verhältnissen verteilt sich beim Menschen der $CO_2$-Transport auf bestimmte Blutfraktionen in einem etwa gleichbleibenden prozentualen Verhältnis (DAVENPORT, 1958). Ein kleiner Teil, etwa 10 %, wird im Plasma physikalisch gelöst (2 - 3 Vol.% im arteriellen Blut, 3 - 3,5 Vol.% im venösen Blut). Ungefähr 20 % sind direkt an eine Aminogruppe des Hämoglobins unter Bildung des labilen Carbhämoglobin gebunden. Der Hauptanteil des $CO_2$, etwa 70 %, wird als Bicarbonat transportiert; davon 25 % in den Erythrozyten und 45 % im Plasma. -
Der $CO_2$-Transport erfolgt vom Gewebe über das venöse Blut zum Alveolarraum unter der Voraussetzung eines $CO_2$-Partialdruckgefälles. Zwischen venösem Blut und Alveolarraum der Lunge besteht eine $CO_2$-Partialdruckdifferenz von etwa 6 mm Hg (ROSSIER und Mitarb., 1958; REIN und SCHNEIDER, 1955). Die beim $CO_2$- bzw. Bicarbonat-Transport im Plasma und in den Erythrozyten ablaufenden Reaktionen sind in Abb. 1 schematisch dargestellt (Schema nach ROUGHTON, 1954).

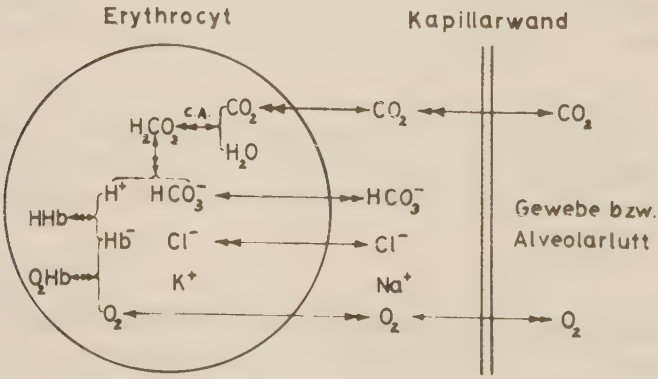



Abb.1 : Schematische Darstellung des Kohlensäureaustausches zwischen Blut und Alveolarluft bzw. Gewebe. C.A. = Carboanhydratase
- ► in der Lunge; ——► bei Gewebspassage

Das durch Decarboxylierungsprozesse in den Gewebszellen anfallende $CO_2$ diffundiert aufgrund eines Partialdruckgefälles ins Plasma und von dort in die Erythrozyten, wo es unter Einfluß der Carboanhydratase zu $H_2CO_3$ hydratisiert wird, die in $H^+$-Ionen und $HCO_3^-$-Ionen dissoziiert. Die $H^+$-Ionen werden von den Histidingruppen des Hämoglobins gebunden, während die Bicarbonationen mit $K^+$-Ionen Kaliumbicarbonat bilden, dessen Konzentrationserhöhung den osmotischen Druck erhöht, so daß $H_2O$ in die Erythrozyten eintritt. Die Folge ist eine durch den Wassereinstrom bedingte Erniedrigung der Konzentration der Chlorionen, die aufgrund des Konzentrationsgefälles aus dem Plasma in die Erythrozyten gelangen, während gleichzeitig äquimolare Mengen Bicarbonationen aus den Erythrozyten ins Plasma diffundieren, wo sie mit $Na^+$-Ionen Natriumbicarbonat ($NaHCO_3$) bilden.

In der Lunge spielt sich praktisch der umgekehrte Vorgang ab: Das in der Lunge oxygenierte Hämoglobin dissoziiert als relativ starke Säure $H^+$-Ionen ab und bindet $K^+$-Ionen und $Na^+$-Ionen. Die frei werdenden $H^+$- und $HCO_3^-$-Ionen verbinden sich zu Kohlensäure, welche unter Einfluß der Carboanhydratase dehydratisiert wird. Das $CO_2$ diffundiert aufgrund einer Partialdruckdifferenz von 6 mm Hg aus dem venösen Blut in den Alveolarraum der Lunge und wird mit der Expirationsluft exhaliert.

## Eigene Untersuchungen

### III. ARBEITSPLAN

Aus der gesichteten Literatur geht hervor, daß es verschiedene Theorien über die Bildung und Sekretion der Bicarbonat- bzw. Carbonationen in der Schalendrüse des Legehuhnes gibt, die jedoch durch experimentelle Daten bislang noch nicht zufriedenstellend gestützt werden konnten.

Die Befunde von HODGES und LORCHER (1967) untermauern erstmals experimentell die Zweifel an der Gültigkeit der Theorie von GUTOWSKA und MITCHELL (1945), wonach die für die Carbonatanteil der Eischale erforderlichen Bicarbonationen aus dem Blut stammen und in den Uteruszellen zu Kohlensäure und Carbonationen disproportioniert werden. Die Autoren stellten fest, daß nach intravenoser Applikation von $C^{14}$-markiertem Bicarbonat keine signifikanten Unterschiede der arterio-venösen $C^{14}$-Aktivitätsdifferenzen zwischen Legehennen ohne Ei im Uterus und solchen während der Eischalenmineralisation nachweisbar sind. Dieser Befund spricht dafür, daß ein direkter Entzug von Bicarbonationen durch den Uterus nicht in der zur Eischalenbildung erforderlichen Menge erfolgt. -
Die Klärung der Frage, ob die Bicarbonationen zur Eischalenmineralisation dem Blut entzogen werden oder nicht, ist noch durch andere Versuchsanstellungen möglich. -

Zunächst sollen, da Messungen dieser Art bislang noch nicht vorliegen, das Ausmaß und die Geschwindigkeit der pulmonalen Elimination des $C^{14}$-Bicarbonates im Blut bei Legehennen in Abhängigkeit vom Funktionsstadium der Schalendrüse bestimmt werden. Hiermit wird eine Bestätigung erhofft, daß die während der Eischalenbildung fest-

gestellte Erniedrigung des pH-Wertes durch Hyperventilation teilweise kompensiert wird - worauf von MONGIN und LACASSAGNE (1966 b) beobachtete Atemfrequenzsteigerungen hinweisen. -

Weiterhin soll bei Legehennen die $C^{14}$-Einbaurate in die teilmineralisierte Eischale bei konstant gehaltener $C^{14}$-Bicarbonataktivität im Blut gemessen und mit der ebenso ermittelten $Ca^{47}$-Einbaurate verglichen werden.
Da der Gesamtbicarbonat- bzw. Gesamtcalciumgehalt des Blutes auch während der Eischalenbildung mehr oder weniger konstant bleibt, müssen die beiden radioaktiven Indikatoren - $C^{14}$-Bicarbonat bzw. Calcium-47 - wenn sie als Maß für das Gesamtbicarbonat bzw. Gesamtcalcium des Blutes betrachtet werden sollen, ebenfalls konstant gehalten werden. Dies kann erzielt werden, indem die pro Zeiteinheit aus dem Blut eliminierten Nuklide in der gleichen Menge per infusionem wieder zugeführt werden.

Zur Bildung von Calciumcarbonat sind äquimolare Mengen Calcium- und Carbonationen erforderlich. Folglich müßten - sofern die Theorie von GUTOWSKA und MITCHELL (1945) zutrifft - während der Eischalenmineralisation pro Zeiteinheit äquimolare Mengen Calcium und Bicarbonat dem Blut entzogen werden. Unter Berücksichtigung des Gesamtbicarbonats bzw. Gesamtcalciums im Blut kann die Hypothese von GUTOWSKA und MITCHELL sodann aufgrund des Verhältnisses zwischen der $C^{14}$- und $Ca^{47}$-Einbaurate in die teilmineralisierte Eischale bestätigt bzw. widerlegt werden.

# IV. TIERMATERIAL UND METHODIK

## A. Versuchstiere

### 1. Anzahl und Auswahl der Versuchstiere

Die experimentellen Untersuchungen wurden an insgesamt 26 Legehennen durchgeführt.
Die Messung der $C^{14}O_2$- und $CO_2$-Exhalationsraten erfolgte an 9 HNL-Legehennen, die aus einer Population von 4000 Legehühnern nach der Legeleistung ausgewählt wurden. Zu Beginn der Versuche befanden sich die etwa 8 Monate alten Hennen im 4. Legemonat. Ihr Körpergewicht betrug durchschnittlich 1,9 kg.
Zur Bestimmung der $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Einbauraten in die Eischale wurden insgesamt 17 HNL-Legehennen herangezogen, die sich im Alter von 22 Monaten am Ende der 2. Legeperiode befanden. Die Auswahl aus einer Population von etwa 200 Legehennen wurde ebenfalls nach der Legeleistung getroffen.

### 2. Haltung und Fütterung

Die einzeln in Batterien gehaltenen Versuchshennen wurden mit einem handelsüblichen Legehennen-Alleinfutter versorgt, das den Bestimmungen zur Führung des DLG-Gütezeichens entsprach und nach der Register-Analyse folgende wertbestimmende Bestandteile enthielt: 18,1 % Rohprotein, 5,1 % Fett, 4,2 % Rohfaser, 11,6 % Asche, 2,8 % Ca, 0,8 % P, 0,16 % Na.
Futter und Wasser konnten die Hennen nach Belieben aufnehmen.
Das automatisch geregelte Lichtprogramm gewährleistete täglich von 6.00 bis 24.00 Uhr eine einheitliche Beleuchtung der Versuchstiere.

## B. Durchführung der Versuche

Insgesamt wurden 2 Experimente durchgeführt, die hier mit I und II bezeichnet werden.

### I.) Messung der $C^{14}O_2$- und $CO_2$-Exhalationsraten nach intramuskulärer Applikation von $C^{14}$-markiertem Na-Bicarbonat in Abhängigkeit vom Funktionszustand der Schalendrüse

#### 1. Anzahl der Versuche

Bei 4 Legehennen erfolgte die Messung der $C^{14}O_2$- und $CO_2$-Exhalationsraten jeweils in folgenden Funktionsstadien der Schalendrüse, die durch digitale Palpation des Uterus überprüft wurden:

a. im Zeitraum zwischen der 1. und 3. Stunde nach der Eiablage - zu einem Zeitpunkt, wo sich noch kein Ei im Uterus befand;

b. im Zeitraum zwischen der 8. und 10. Stunde nach Ablage eines Eis, d.h. in der Phase der intensivsten Eischalenmineralisation des nachfolgenden Eis.

c. Darüber hinaus sind bei 5 weiteren Legehennen die Exhalationsraten in der Endphase der Calcifikation der Eischale - in der Zeit zwischen der 18. und 21. Stunde nach Ablage des letzten Eis gemessen worden.

Bei allen Hennen wurde die Messung der $C^{14}$-Exhalationsaktivität nach intramuskulärer Verabreichung von 5 $\mu$Ci $C^{14}$-markiertem Na-Bicarbonat in einem Versuchszeitraum von 90 Minuten vorgenommen.

## 2. Versuchsanordnung - Arbeitsgang

### a. Anlegen der Atemhaube

Die für die Messung der Exhalationsrate erforderliche Atemhaube besteht aus einem durchsichtigen Kunststoffbehälter von 18 cm Höhe, 10 cm Breite und Länge. Die Vorderwand der Atemhaube wird von einem Gummischlauch von 1 cm Durchmesser durchbohrt, der zum Rotameter des Exhalationsmeßgerätes führt; die Rückwand der Haube ist mit mehreren Löchern versehen, durch die Luft einströmen kann. -

Der Kopf des Huhnes befand sich während der Untersuchung in dieser Atemhaube, wobei eine an ihr befestigte manschettenartige Kunststoffolie den Hals des Tieres umschloß, so daß die Haube gut fixiert war. In einem eigens für das Huhn konstruierten Gestell wurden die Beine des Versuchstieres durch zwei Schlitze einer hängemattenartigen, leicht zu reinigenden Kunststoffolie gesteckt und unterhalb der Folie festgebunden. Ein Flügel wurde seitlich ausgebunden.

### b. Dosierung des $C^{14}$-markierten Na-Bicarbonats

Bei dem hohen Wirkungsgrad der Meßanordnung reichten für die Ermittlung der $C^{14}O_2$-Exhalationsrate 5 $\mu$Ci des $C^{14}$-markierten Na-Bicarbonates. Die für die Injektion erforderliche Lösung wurde durch die Verdünnung von 1 mCi $C^{14}$-markiertem Na-Bicarbonat in 50 ml Trispuffer (pH = 7,5) angesetzt. 0,25 ml dieser Lösung enthielten somit eine Aktivität von 5 $\mu$Ci. Diese Dosis wurde dem Huhn mit einer 1 ml-Rekordspritze in die Brustmuskulatur appliziert.

---

(Bezugsquelle für das Natriumbicarbonat $C^{14}$: The radiochemical Centre, Amersham/England.
Konzentration der Radioaktivität: 1 mCi in 0,5 ml Aqua dest.
Molekulargewicht: 84
pH-Wert der Lösung: 8,9 )

## 3. Meßtechnik

Um die pulmonale Elimination des $C^{14}$-markierten Bicarbonates nach intramuskulärer Verabreichung quantitativ zu verfolgen, haben wir das $C^{14}O_2$-$CO_2$-Exhalationsmeßgerät FHT 50 A (Firma Frieseke & Hoepfner, Erlangen-Bruck) eingesetzt.

### a. Beschreibung und Arbeitsweise des Exhalationsmeßgerätes FHT 50 A

Das fahrbare Laborgerät besitzt eine Dosierpumpe, welche Luft durch die im vorigen Abschnitt beschriebene Atemhaube in je eine Meßküvette zur Bestimmung der $CO_2$-Konzentration und der $C^{14}$-Aktivität saugt. Die $C^{14}$-Aktivität des exhalierten $C^{14}O_2$ wird in einer 500 $cm^3$ großen Meßküvette erfaßt, die sich zwischen großflächigen Methandurchflußzählrohren befindet.

Die $CO_2$-Konzentration wird mit einem parallel geschalteten Infrarot-Absorptionsmeßgerät bestimmt. Ein Dreifarben-Kompensations-Punktdrucker registriert nacheinander die $C^{14}$-Impulsrate, die $CO_2$-Konzentration und die spezifische Aktivität (Quotient aus beiden Meßwerten).

Ferner werden die exhalierte $CO_2$-Rate sowie die $C^{14}$-Impulsrate fortlaufend integriert, wobei die zeitlichen Integralwerte der Impulsrate als rote ($C^{14}$) und die Integralwerte der $CO_2$-Rate als grüne ($CO_2$) Randmarkierungen erscheinen (vgl. Abb. 2).

Die in der Zeiteinheit ausgeatmete $C^{14}$-Aktivität ist:

$$a = \frac{I \cdot J}{K_1} \qquad \text{(in } \mu\text{Ci pro Min.)}$$

Die während der Versuchsdauer T ausgeatmete $C^{14}$-Gesamtaktivität wird durch Integration der Impulsrate pro Minute über die Versuchszeit (T) ermittelt:

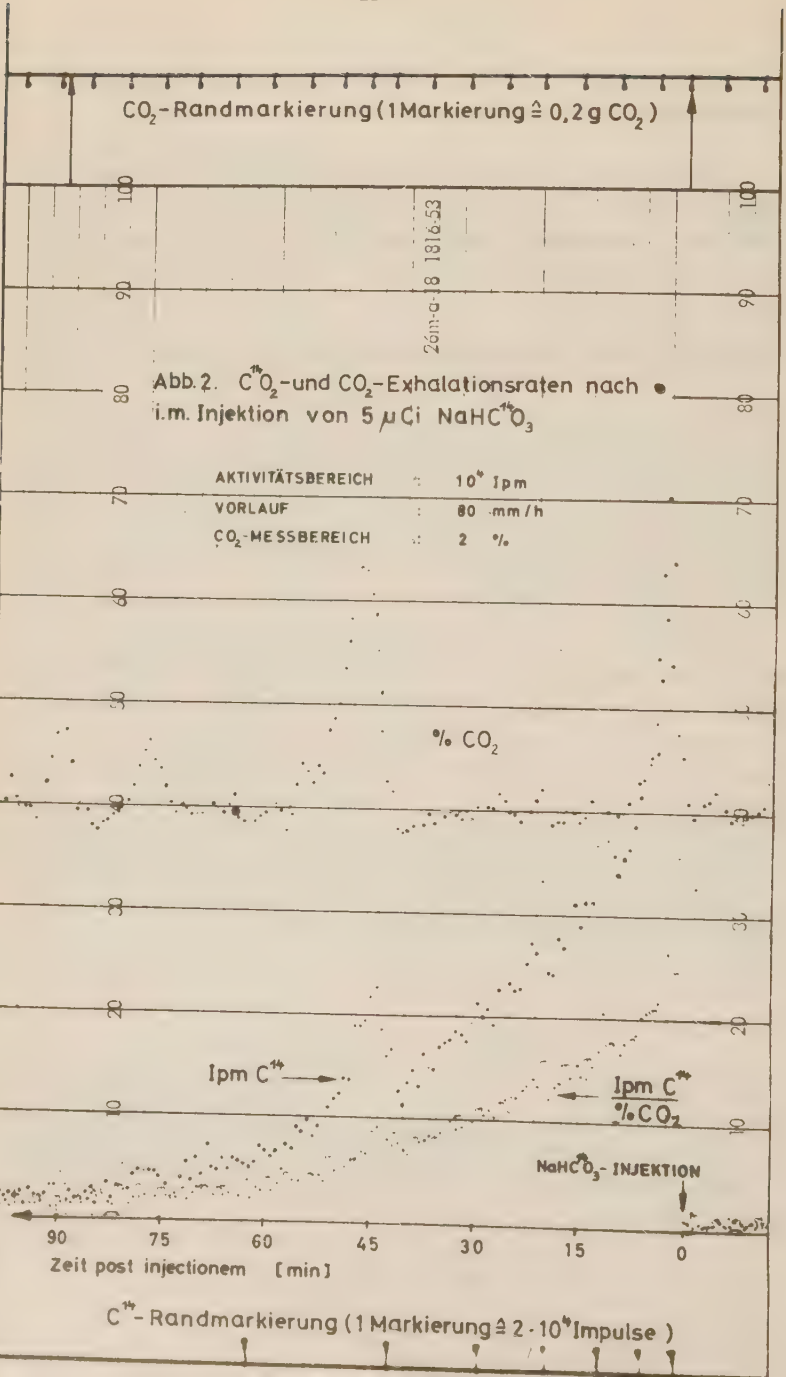



Abb. 2. $C^{14}O_2$-und $CO_2$-Exhalationsraten nach i.m. Injektion von 5 $\mu$Ci $NaHC^{14}O_3$

$$A = \int_0^T adt = \frac{\dot{\Phi}}{K_1} \int_0^T I\,(t)\,dt \text{ in } \mu Ci$$

I = Impulsrate in Imp./Min.

$\dot{\Phi}$ = Gasdurchflußmenge in $cm^3$/Min.

$K_1$ = Eichkonstante in $\frac{\text{Imp./Min.}}{\mu Ci/cm^3}$

(Die Eichkonstante ist vergleichbar mit dem Geometriefaktor ähnlicher Meßanordnungen und wurde durch Messung eines $C^{14}O_2$-Eichgases bekannter Radioaktivität unter Verwendung der 500 $cm^3$ fassenden Meßküvette bestimmt.)

Bei unseren Versuchen wurde die Gasdurchflußmenge ($\dot{\Phi}$) konstant bei 2500 $cm^3$/Min. gehalten.
Die $C^{14}$-Aktivitätsmessung erfolgte stets im Aktivitatsbereich $10^4$ Ipm unter Verwendung einer 500 $cm^3$ fassenden Küvette; die $CO_2$-Messung wurde im Konzentrationsbereich 2 Vol. % vorgenommen.

b. Methode zur Bestimmung einer Bezugsgröße

Als Bezugsgröße für die am Huhn gemessene $C^{14}$-Exhalationsaktivität diente die in vitro unter den gleichen Meßbedingungen ermittelte $C^{14}$-Aktivität der Injektionslösung.
Hierzu haben wir folgende Methode entwickelt, die hier kurz beschrieben werden soll:

Auf einen Dreihals-Rundkolben wurde ein mit 0,5 n HCl gefüllter Tropftrichter aufgesetzt. Der eine Hals des Rundkolbens war durch einen Gummischlauch mit dem Rotameter des Exhalationsmeßgerätes verbunden, während vom anderen Hals aus eine dünne Glasröhre nach innen bis fast auf den Boden des Kolbens reichte. In den Rundkolben wurden

30,00 ml 1 n Na-Bicarbonatlösung in Trispuffer
+ 0,25 ml (= 5 $\mu$Ci) $C^{14}$-markiertes Bicarbonat
+ einige Tropfen Methylrot als Indikator

pipettiert. Das Ganze wurde schließlich gegen 0,5 n HCl titriert. Die Dosierpumpe des Exhalationsmeßgerätes FHT 50 A saugte das sich entwickelnde $C^{14}O_2$ und $CO_2$ zur Messung ab. Durch die oben erwähnte Glasröhre strömte kontinuierlich Luft von außen durch die im Rundkolben befindliche Flüssigkeit.

Der Farbumschlag des Indikators diente bei Säureüberschuß als Hinweis für das Ende der $C^{14}O_2$- und $CO_2$-Entwicklung.

## II. Ermittlung der $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Einbaurate in die Eischale bei konstanter $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Bicarbonat-Aktivität im Blut

Die Bestimmung der $Ca^{47}$- und/oder $C^{14}$-Einbaurate in die teilmineralisierte Eischale erfolgte aus bereits im Arbeitsplan dargelegten Gründen bei konstant gehaltener $Ca^{47}$- und/oder $C^{14}$-Bicarbonat-Aktivität im Blut.

### 1. Anzahl der Versuche

a. Die Einbaurate von $Ca^{47}$ in die teilmineralisierte Eischale wurde bei 6 Legehennen bestimmt.

b. Die Ermittlung der Einbaurate von $C^{14}$ aus $C^{14}$-Bicarbonat in die teilmineralisierte Eischale erfolgte ebenfalls an 6 Legehennen.

c. Bei 5 Legehennen bestimmten wir die Einbauraten von $Ca^{47}$ und $C^{14}$ aus $C^{14}$-Bicarbonat in die teilmineralisierte Eischale nach simultaner Infusion beider Nuklide (Doppelmarkierung).

### 2. Versuchsanordnung - Arbeitsgang

#### a. Kanülierung der Flügelvenen

Die kontinuierliche Infusion von $C^{14}$-markiertem Na-Bicarbonat so-

wie von $Ca^{47}$ erfolgte in die rechte und die Entnahme der Blutproben in Abständen von 15 - 20 Minuten aus der linken Flügelvene. Beide Venen wurden zu diesem Zwecke freipräpariert, so daß eine 30 cm lange, mit 0,004 %iger Heparinlösung gefüllte, an einem Ende mit einer Arterienklemme verschlossene Plastikvenüle ($P_1$ - $P_2$) ca. 5 cm im Lumen der Flügelvene fixiert werden konnte.

b. Dauerinfusion der Nuklide

Zur Erzielung einer meßbaren, konstanten $Ca^{47}$- bzw. $C^{14}$-Bicarbonat-Aktivität im Blut wurden eine $Ca^{47}$-Losung der Konzentration von 2 $\mu$Ci pro ml mit einer Geschwindigkeit von 0,02 ml/Min. bzw. eine $C^{14}$-Bicarbonatlösung (10 $\mu$Ci/ml) mit einer Geschwindigkeit von 0,075 ml/Min. kontinuierlich im Versuchszeitraum von 2 Stunden infundiert. Die Infusion der Nuklide wurde durch 2 Dauerinfusionsapparaturen (UNITA II der Fa. Braun, Melsungen) bewerkstelligt, deren Infusionsgeschwindigkeiten in 12 Stufen, und zwar von 0,0075 ml/Min. bis 0,5 ml/Min., wählbar waren.

Bei simultaner Infusion von $Ca^{47}$ und $C^{14}$-Bicarbonat wurden beide Infusionsgeräte durch Plastikschläuche ($P_5$) über ein gemeinsames Y-Zwischenstück aus Metall mit der Plastikvenüle der rechten Flügelvene verbunden.

---

$Ca^{47}$-Bezugsquelle: The Radiochemical Centre, Amersham/England.
$Ca^{47}$-Aktivität: 100 $\mu$Ci in 2 ml isotonischer Calciumchloridlsg.
Calciumgewicht: 0,66 mg
Verdünnung: 20 $\mu$Ci $Ca^{47}$-Chloridlösung in 10 ml Trispuffer (pH = 7,5)
$C^{14}$-Bicarbonat: Herkunft und Verdunnung: siehe unter Versuch I, Abschnitt 2 b)

---

## 3. Meßtechnik - Analytik

### a. Kontrolle der konstanten $C^{14}$-Bicarbonat-Aktivität im Blut

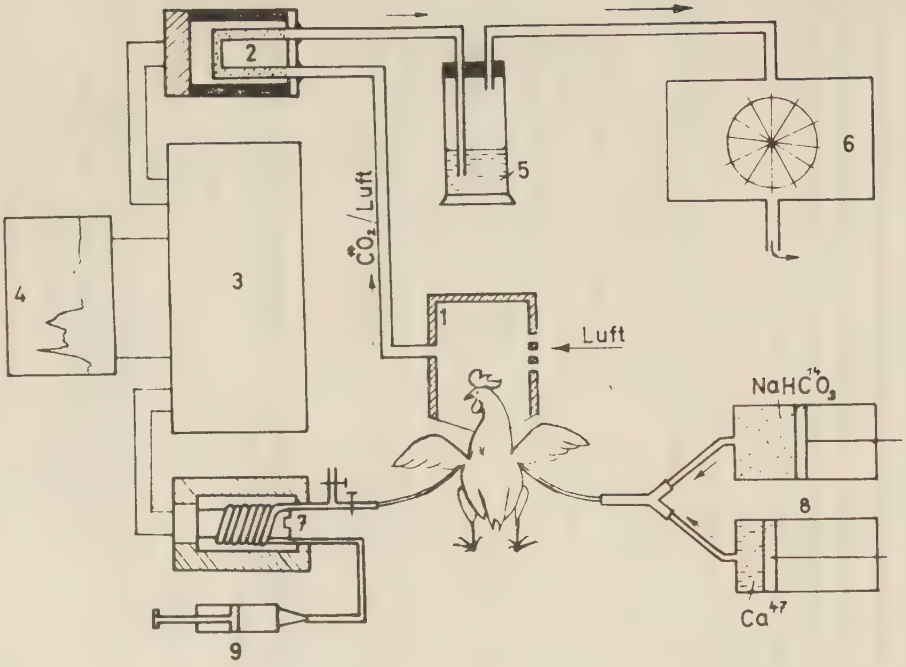
Die Kontrolle erfolgte durch kontinuierliche Messung der $C^{14}O_2$-Exhalationsaktivität. Hierbei wurde methodisch wie folgt vorgegangen (vgl. dazu Abb. 3):
Die Exhalationsluft des wie unter I. 2 a fixierten und mit einer Atemhaube versehenen Versuchshuhnes wurde mit Hilfe einer Saugpumpe (Heraeus-Einblockpumpe der Fa. Hochvakuum GmbH, Hanua) durch eine U-förmige, mit Anthracenpulver (Scintillator) gefüllte Durchflußzelle gesaugt. Diese Meßzelle, die einen Teil des Flow-Detector (Packard Instrument GmbH, Modell 3041) darstellt, stand in Verbindung mit einem Scintillationsspektrometer (Packard Instrument GmbH, Modell 3022), dessen Schreiber die $C^{14}$-Exhalationsaktivität in Ipm (Impulse pro Minute) aufzeichnete.
Der $C^{14}$-Kanal des Scintillationsspektrometers war wie folgt eingestellt:

Verstärkung: 10 %
Fenstereinstellung: 150 - 800 Teilstriche

Die Pumpe saugte das exhalierte $C^{14}O_2$ anschließend durch eine mit Barytwasser gefüllte Waschflasche, wobei $C^{14}$-markiertes Bariumkarbonat ausfiel.
Zur Überprüfung der konstanten $C^{14}$-Bicarbonataktivität im Plasma wurden zusätzlich in Abständen von 20 - 30 Minuten aus der linken Venüle etwa 2 ml Blut mit Hilfe einer Rekordspritze entnommen.

### b. Kontrolle der konstanten $Ca^{47}$-Aktivität im Blut

Um die Konstanz der $Ca^{47}$-Aktivität im Blut laufend zu überprüfen, entwickelten wir folgende Methode (vgl. dazu Abb. 3):




1 Atemhaube
2 U-förmige Durchfluß-zelle mit Anthracen - pulver
3 Scintillationspektro - meter
4 Schreiber
5 Barytwasser
6 Saugpumpe
7 NaJ-Kristall
8 Infusionsapparat
9 Rekordspritze

Abb. 3: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung

Die Plastikvenüle der linken Flügelvene wurde mit einem PVC-Schlauch der Größe $P_5$ verbunden und spiralig um einen NaJ-Kristall gewickelt, der als Detektor für die $\gamma$-Quanten des $Ca^{47}$ diente (Packard Instrument GmbH, Modell 5052). Mittels einer 20 ml Rekordspritze, die an das Ende des mit 0,004 %iger Heparinlösung in physiologischer NaCl gefüllten Plastikschlauches angesetzt wurde, konnten in Abständen von 15 - 20 Minuten jeweils ca. 4 ml Blut aus der Vene des Versuchshuhnes in diese Meßanordnung gesogen werden. Dort wurde die $Ca^{47}$-Aktivität des Vollblutes 3 - 4 Minuten gemessen und die Impulsrate vom Schreiber des Scintillationsspektrometers (Packard Instrument GmbH, Modell 3022) in Ipm aufgezeichnet. Der Kanal zur Erfassung der beim Zerfall des $Ca^{47}$ auftretenden 1,31 MeV-$\gamma$-Strahlung wurde wie folgt eingestellt:

Verstärkung: 10 % } entspricht einem
Fenstereinstellung: 150 - 800 Teilstriche } Energiebereich von 0,3 - 1,6 MeV

Im Anschluß an die Messung der $Ca^{47}$-Aktivität wurde das Blut mit der Rekordspritze größtenteils wieder in das Huhn zurückgepumpt. Mit Hilfe eines Dreiwegehahnes, der zwischen der Venüle und dem $P_5$-Plastikschlauch montiert war, wurden nach jeder Messung beim Zurückpumpen des Blutes ca. 2 ml Blut in ein Zentrifugenglas aufgefangen, um anschließend die $Ca^{47}$-Aktivität bzw. die $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Aktivität im Falle der Doppelmarkierung in 1 ml Plasma nach der im folgenden Abschnitt beschriebenen Methode zu bestimmen.

c. Aufarbeitung der Blutproben und Messung der darin enthaltenen $Ca^{47}$- und/oder $C^{14}$-Aktivität

$\alpha$. Plasmagewinnung

Jeweils ca. 2 ml des aufgefangenen, schwach heparinisierten Blutes wurden im Zentrifugenglas unter Paraffinöl geschichtet, um einen

Austausch von $C^{14}O_2$ mit dem $CO_2$ der Luft zu verhindern. Auf diese Unterschichtung konnte verzichtet werden, wenn lediglich die $Ca^{47}$-Aktivität der Blutproben ermittelt werden sollte. Nach 10-minütigem Zentrifugieren der Blutproben bei 3500 U/Min. wurde die $Ca^{47}$- bzw. $C^{14}$-Aktivität des überstehenden Plasmas wie folgt gemessen:

ß. Messung der $Ca^{47}$-Aktivität im Plasma

1 ml Plasma wurde in ein Reagenzglas pipettiert. Die Messung der 1,31 MeV-$\gamma$-Strahlung des in der Plasmaprobe enthaltenen $Ca^{47}$ erfolgte spektrometrisch (Autogamma-Spektrometer der Fa. Packard Instrument GmbH, Modell 5020/5019 in Verbindung mit Modell 3375), und zwar so, daß die $\gamma$-Energie des ebenfalls radioaktiven Folgenuklids Scandium 47 (0,16 MeV), das beim Zerfall des $Ca^{47}$ entstand, ausgeblendet wurde (Spektrometereinstellung wie unter Versuch II. 3 b). Als Bezugsgröße diente eine bekannte Menge gelöstes $Ca^{47}$, das unter den gleichen geometrischen und spektrometrischen Bedingungen zur Messung kam.

$\gamma$. Messung der $C^{14}$-Aktivität im Plasma

Im Gegensatz zu $Ca^{47}$, bei dessen Zerfall außer Betakorpuskeln auch $\gamma$-Quanten emittiert werden, ist $C^{14}$ ein reiner ß-Strahler (E max 0,159 MeV).
Die Messung der $C^{14}$-Aktivität in den Plasmaproben erfolgte unter Anwendung der Flüssig-Scintillationsspektrometrie:

1 ml Plasma wurde mit 6 ml Methanol versetzt, wobei das Plasmaeiweiß ausflockte. Anschließend erfolgte 10-minütiges Zentrifugieren bei 4000 U/Min.
Zu 15 ml Dioxan-Scintillator, bestehend aus:

| | | |
|---|---|---|
| | 5,000 g | 2,5-Diphenyloxazol (PPO) |
| + | 0,125 g | 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol (Dimethyl-POPOP) |
| + | 100,000 g | Naphthalin |
| | ad 1 l | Dioxan, |

wurden jeweils 5 ml des klaren Überstandes in ein Meßgläschen pipettiert.

Die in der Probe enthaltene $C^{14}$-Aktivität wurde mit dem Tri Carb Scintillationsspektrometer (Packard Instrument GmbH, Modell 3375) bei 10 % Verstärkung und einer Einstellung der Diskriminatoren des roten Kanals von 50 - 1000 Teilstrichen gemessen.
Als Bezugsgröße dienten identisch hergestellte Standardpräparate, die eine definierte Menge des $C^{14}$-markierten Na-Bicarbonats enthielten.

δ. Gleichzeitige Messung der $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Aktivität im Plasma (bei Doppelmarkierung)

Bei simultaner Infusion von $Ca^{47}$ und $C^{14}$-markiertem Bicarbonat wurde die in den Plasmaproben enthaltene $Ca^{47}$-Aktivität γ-spektrometrisch erfaßt und die β-Energie des $C^{14}$ wie folgt von den β-Energien des $Ca^{47}$ und $Sc^{47}$ mit Hilfe des Tri Carb Scintillationsspektrometers diskriminiert:

| | | |
|---|---|---|
| $Ca^{47}/Sc^{47}$-Kanal: (blauer Kanal) | Fenstereinstellung: | 415 - 900 Teilstriche |
| | Verstärkung: | 1 % |
| | In diesem Kanal erscheint keine $C^{14}$-Aktivität. | |
| $Ca^{47}/Sc^{47}/C^{14}$-Kanal: (grüner Kanal) | Fenstereinstellung: | 30 - 300 Teilstriche |
| | Verstärkung: | 1 % |

Die im letztgenannten Kanal erscheinende $Ca^{47}$- und $Sc^{47}$-β-Aktivität wurde als Fraktion der im blauen Kanal erscheinenden $Ca^{47}$- und $Sc^{47}$-Impulse vorher bestimmt, so daß sich der im $Ca^{47}/Sc^{47}/C^{14}$-Kanal auf $C^{14}$ entfallende Anteil auf dem Differenzwege berechnen ließ.

Darüber hinaus wurde die $C^{14}$-Aktivität der doppelt markierten Proben nach Abstrahlung des $Ca^{47}/Sc^{47}$, die eine Halbwertzeit von 4,7 bzw. 3,4 Tagen aufweisen, erneut gemessen. Als Bezugsgrößen dienten identisch präparierte Standards der einzelnen Nuklide ($Ca^{47}/Sc^{47}$ bzw. $C^{14}$-Bicarbonat).

d. Aufarbeitung der Eischale und Messung der in ihr enthaltenen $Ca^{47}$- und/oder $C^{14}$-Aktivität

$\alpha$. Gewinnung der Eier und Aufarbeitung der Eischalen

Nach Beendigung des Versuches (2 Stunden) wurde das jeweilige Versuchshuhn mit 2 - 5 I.E. Oxytocin ("Orasthin") i. v. zur Eiablage provoziert, die in der Regel 2 - 3 Minuten post injectionem erfolgte. Der Inhalt der gewonnenen Eier wurde verworfen und die Eischale nach eingehender Spülung mit Wasser 3 Stunden im Brutschrank bei 105° C getrocknet.

$\beta$. Messung der $Ca^{47}$-Aktivität

0,5 g Eischale wurden mit der Analysenwaage ausgewogen, in ein Reagenzglas gefüllt und im Bohrloch des Autogamma-Spektrometers (vgl. Abschnitt 3 c, $\beta$) zur Messung gebracht.

$\gamma$. Messung der $C^{14}$-Aktivität

100 mg Eischale wurden pulverisiert und in 15 g Gel-Scintillator, bestehend aus:

| | | |
|---|---|---|
| | 5,0 g | 2,5-Diphenyloxazol (PPO) |
| + | 0,1 g | 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol (Dimethyl-POPOP) |
| + | 43,0 g | Aerosil |
| + | 8,0 g | Etophen |
| | ad 1 l | Toluol |

suspendiert. Die Probengläschen wurden verschraubt und anschließend

leicht geschüttelt. Die Messung der $C^{14}$-Aktivität erfolgte mit dem Tri Carb Scintillationsspektrometer in gleicher Weise wie die Messung der $C^{14}$-Aktivität der Plasmaproben (vgl. Abschnitt 3 c, $\gamma$).

$\delta$. Messung der sowohl $C^{14}$- als auch $Ca^{47}$-markierten Eischale

Bei doppelt markierten Eischalen erfolgte die Messung der $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Aktivität nach dem gleichen Prinzip wie die Messung der Aktivitäten der Plasmaproben (vgl. Abschnitt 3 c, $\delta$), jedoch unter Verwendung des unter Abschnitt 3 d, $\gamma$ beschriebenen Gel-Scintillators.

## V. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der im Kapitel "Methodik" beschriebenen experimentellen Untersuchungen werden in einzelne Abschnitte unterteilt nachstehend dargestellt:

### 1. Die $C^{14}O_2$- und $CO_2$-Exhalationsraten in Abhängigkeit vom Funktionsstadium der Schalendrüse

Die $C^{14}O_2$-Exhalationsrate wurde bei 9 Legehennen in Abhängigkeit vom Funktionszustand der Schalendrüse nach intramuskulärer Applikation von 5 $\mu$Ci $C^{14}$-markiertem Na-Bicarbonat ermittelt. An einem Berechnungsbeispiel soll der Rechengang zur Bestimmung der $C^{14}O_2$-Exhalationsrate demonstriert werden:

In dem betrachteten Versuchszeitraum zeichnete der Schreiber des Exhalationsmeßgerätes z. B. beim Versuchshuhn Nr. 3 (kein Ei im Uterus) 6 Randmarkierungen (Integralwerte der Impulsrate). Durch Interpolation mit der nachfolgenden Markierung wurde die Genauigkeit auf ein Zehntel Randmarkierung erhöht, so daß insgesamt 6,4 Randmarkierungen auf den Versuchszeitraum entfielen. Als vergleichbare Bezugsgröße für die am Huhn gemessene $C^{14}$-Exhalationsaktivität diente die unter den gleichen Versuchsbedingungen in vitro ermittelte $C^{14}$-Aktivität der Injektionsdosis (0,25 ml $C^{14}$-Bicarbonatlösung = 5 $\mu$Ci $C^{14}$). Sie wurde aus Gründen größtmöglicher Meßsicherheit, wegen der beobachteten Unbeständigkeit der $C^{14}$-Bicarbonatlösung, jeweils vor jeder $C^{14}$-Exhalationsmessung nach der im Kapitel Methodik unter Versuch I, Abschnitt 3 b, beschriebenen Methode ermittelt und gleich 100 % gesetzt.

Die In-vitro-Messung der $C^{14}$-Bicarbonatdosis, die dem Versuchshuhn Nr. 3 injiziert wurde, ergab z. B. 7,2 Randmarkierungen. Die $C^{14}$-Exhalationsaktivität läßt sich wie folgt als prozentualer Anteil der injizierten $C^{14}$-Dosis berechnen:

$$\frac{\text{Aktivität der Injektionsdosis (Markierungen)}}{\text{Exhalationsaktivität (Markierungen)}} = \frac{100\ \%}{x\ \%}$$

$$x = \frac{6,4\ .\ 100\ \%}{7,2} = \underline{88,8\ \%}$$

Während der 90-minütigen Versuchsdauer wurden also 88,8 % der als $C^{14}$-Bicarbonat injizierten $C^{14}$-Dosis exhaliert. Die auf diese Weise bei 9 Versuchshühnern ermittelten $C^{14}O_2$-Exhalationsraten werden in Tabelle 1 zusammengestellt.

---

Parallel zur Bestimmung der $C^{14}O_2$-Exhalationsrate erfolgte im gleichen Versuchszeitraum die Messung der exhalierten $CO_2$-Menge - ebenfalls in Abhängigkeit vom Funktionszustand der Schalendrüse. Der Rechengang zur Bestimmung der exhalierten $CO_2$-Gesamtmenge (G) wird am nachstehenden Berechnungsbeispiel verdeutlicht:

Wir zählen während der 90-minütigen Versuchsdauer z. B. 21 vom Schreiber des Exhalationsmeßgerätes aufgezeichnete Randmarkierungen. Wie mit Hilfe von Eichgasen vorher ermittelt wurde, entspricht eine Markierung bei einem Luftdurchfluß von 2500 $cm^3$/Min. (Meßbereich 2 % $CO_2$ = Vollausschlag) 0,2 g $CO_2$.
Demnach beträgt die Gesamtmenge $CO_2$:

$$G = 0,2\ g\ .\ 21\ \text{(Markierungen)} = \underline{4,2\ g}$$

Die Umrechnung in Liter $CO_2$ ist aufgrund folgender Überlegung möglich:

1 Mol eines jeden Gases hat bei 760 Torr das Volumen von 22,4 l ("Molvolumen"). Das Molekulargewicht von $CO_2$ beträgt 44 g.

$$44 \text{ g } CO_2 = 1 \text{ Mol } \hat{=} 22{,}4 \text{ l}$$

$$\frac{44 \text{ g } CO_2}{4{,}2 \text{ g } CO_2} = \frac{22{,}4 \text{ l}}{x \text{ l}}$$

$$x = \frac{22{,}4 \cdot 4{,}2}{44} = \underline{2{,}13 \text{ l}}$$

Im betrachteten Versuchszeitraum wurden also 2,13 l $CO_2$ exhaliert.

Die Zusammenstellung der auf diese Weise bei den einzelnen Legehennen ermittelten $CO_2$-Meßwerte erfolgt in Tabelle 1.

---

In der Tabelle 1 werden die $C^{14}O_2$- und $CO_2$-Exhalationsraten von 9 Versuchshennen unter Berücksichtigung der jeweiligen Funktionsstadien der Schalendrüse einander gegenübergestellt. Aus dieser Gegenüberstellung der Meßwerte geht hervor, daß Hennen, die kein Ei im Uterus hatten, durchschnittlich 85,51 $\pm$ 5,04 % der als $C^{14}$-Bicarbonat injizierten $C^{14}$-Dosis und 1,839 $\pm$ 0,171 l $CO_2$ im Versuchszeitraum von 90 Minuten ausatmeten. Dagegen exhalierten die gleichen Hennen in der Phase der intensivsten Eischalenmineralisation (8. - 16. Std. nach Ablage des letzten Eis) durchschnittlich 90,39 $\pm$ 6,21 % der injizierten $C^{14}$-Bicarbonatdosis und 2,013 $\pm$ 0,204 l $CO_2$- Dieser Unterschied zwischen den gemittelten $C^{14}O_2$- bzw. $CO_2$-Exhalationsraten, dessen Größe innerhalb der berechneten Standardabweichung liegt, läßt sich bei einer Anzahl von nur 9 Versuchstieren statistisch nicht sichern.

Prüft man jedoch die jeweiligen Paardifferenzen, das sind die Differenzen der paarweise zusammengehörigen Exhalationswerte ein und

Tabelle 1

$C^{14}O_2$- und $CO_2$-Exhalationsraten in Abhängigkeit vom Funktionszustand der Schalendrüse nach intramuskulärer Applikation von 5 µCi $C^{14}$-markiertem Na-Bicarbonat bei Legehennen (Versuchsdauer 90 Minuten)

| Versuchshuhn Nr. | kein Ei im Uterus | | Ei im Uterus | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1. - 3. Std. nach Ablage des letzten Eis | | Phase d. intensivsten Mineralisation (8. - 16. Std. nach Ablage des letzten Eis) | | Endphase der Mineralisation (18. - 21. Std. nach Ablage des letzten Eis) | |
| | $C^{14}O_2$-Exhal.Rate in % der injiz. $C^{14}$-Dosis | $CO_2$-Exhalation in l | $C^{14}O_2$-Exhal.Rate in % der injiz. $C^{14}$-Dosis | $CO_2$-Exhalation in l | $C^{14}O_2$-Exhal.Rate in % der injiz. $C^{14}$-Dosis | $CO_2$-Exhalation in l |
| 3 | 88,84 | 1,985 | 90,80 | 2,130 | | |
| 7 | 86,50 | 1,883 | 98,42 | 1,985 | | |
| 27 | 85,71 | 2,036 | 88,76 | 2,239 | | |
| 18 | 88,62 | 1,934 | 98,37 | 1,943 | | |
| 1 | 89,29 | 1,862 | 91,78 | 2,137 | 95,43 | 2,188 |
| 6 | 88,61 | 1,885 | 93,34 | 1,985 | 86,24 | 2,112 |
| 9 | 90,13 | 1,588 | 89,09 | 1,577 | 93,46 | 1,608 |
| 17 | 74,08 | 1,527 | 79,54 | 2,219 | 88,77 | 1,705 |
| 28 | 77,89 | 1,852 | 83,49 | 1,903 | 97,28 | 1,812 |
| Mittelwerte | 85,51 | 1,839 | 90,39 | 2,013 | 92,23 | 1,885 |
| Standardabweich. | ± 5,64 | ± 0,171 | ± 6,21 | ± 0,204 | ± 4,61 | ± 0,254 |

derselben Versuchshennen - während und außerhalb des Stadiums der Eischalenmineralisation - nach dem Rangfolgentest von WILCOXON (WINNE, 1964; GEIGY, 1960), so zeigt sich, daß in der Phase der intensivsten Eischalenmineralisation mit $p < 0,01$ signifikant mehr $C^{14}O_2$ ausgeatmet wurde. Die Paardifferenz der $CO_2$-Exhalationswerte ließ sich ebenfalls mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ statistisch sichern.

In der Endphase der Mineralisation (18. - 21. Std. nach Ablage des letzten Eis) betrug die $C^{14}$-Exhalationsaktivität durchschnittlich 92,23 $\pm$ 4,61 % der verabfolgten $C^{14}$-Dosis, während die zur gleichen Zeit ausgeatmete $CO_2$-Menge mit durchschnittlich 1,885 $\pm$ 0,254 l $CO_2$ beziffert wurde. Die Paardifferenzen zwischen den in der Endphase und in der Phase der intensivsten Eischalenmineralisation gemessenen Exhalationsraten ließen sich statistisch nicht sichern.

Abschließend sei in diesem Abschnitt vermerkt, daß die pulmonale Elimination des $C^{14}$-markierten Bicarbonats näherungsweise einer eingliedrigen Exponentialfunktion gehorchte, die im semilogarithmischen Koordinatensystem eine Gerade ergab, wobei die noch nicht exhalierte $C^{14}$-Aktivität semilogarithmisch gegen die Zeit nach der Injektion des $C^{14}$-markierten Bicarbonats aufgetragen wurde. Die Abb. 4 zeigt den Verlauf der Exponentialkurven bei ein und derselben Henne jeweils in der Phase mit (a) und ohne (b) Eischalenverkalkung. Vergleicht man den Verlauf beider Kurven miteinander, so wird deutlich, daß innerhalb des gleichen Versuchszeitraumes von 90 Minuten während der Eischalenmineralisation mehr $C^{14}$-Bicarbonat über die Lunge eliminiert wurde als im Zeitabschnitt ohne Eischalenbildung.

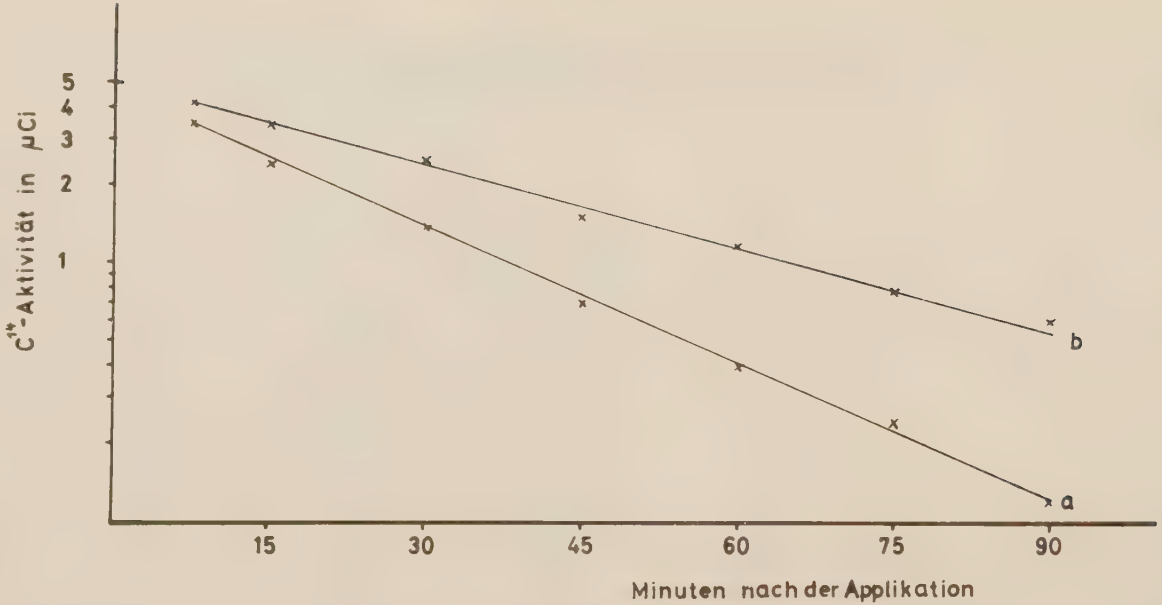



Abb. 4: $C^{14}$-Eliminationsrate in Abhängigkeit von der Zeit nach intramuskulärer Applikation von 5 µCi $NaHC^{14}O_3$ in der Phase mit (a) und ohne (b) Eischalenverkalkung

## 2. Die $Ca^{47}$-Einbaurate in die teilmineralisierte Eischale bei konstant gehaltener $Ca^{47}$-Aktivität im Blut

Aus den im Arbeitsplan bereits erwähnten Gründen erfolgte die analytische Bestimmung der Einbaurate von $Ca^{47}$ in die Eischale bei konstant gehaltener $Ca^{47}$-Aktivität im Blut.

Abb. 5 zeigt, daß die in Abständen von 15 - 20 Minuten vom Schreiber des Scintillationsspektrometers in Ipm aufgezeichnete $Ca^{47}$-Aktivität z. B. beim Versuchshuhn Nr. 19 während der 2-stündigen Versuchsdauer nur geringfügig im Bereich von 450 bis 550 Ipm schwankte. Des weiteren betrug die in jeweils 1 ml Plasma in anderer Zählanordnung gemessene $Ca^{47}$-Aktivität von 5 während des Versuchszeitraumes entnommenen Blutproben - bei dem als Beispiel dienenden Versuchshuhn Nr. 19 - durchschnittlich 326 $\pm$ 34 Ipm.

Die in der Eischale nach 2-stündiger Versuchsdauer gemessene $Ca^{47}$-Aktivität wird als Einbaurate (-Ei) bezeichnet und auf die während des Versuchszeitraumes insgesamt infundierte $Ca^{47}$-Aktivität bezogen:

$$\frac{Ca^{47}\text{-Aktivität infundiert (Ipm)}}{Ca^{47}\text{-Aktivität pro Eischale (Ipm)}} = \frac{100\ \%}{x\ \%}$$

Beispiel: Bei Huhn Nr. 19 ergaben sich folgende Meßwerte:

| | | |
|---|---|---|
| 0,1 ml $Ca^{47}$-Standardlösung (s) | $\hat{=}$ | 30 052 Ipm |
| $Ca^{47}$-Gesamtverbrauch in 2 Std. (G) | = | 2,9 ml |
| $Ca^{47}$-Aktivität infundiert ($A_i$) ($A_i = G \cdot s \cdot 10$) | $\hat{=}$ | 871 508 Ipm |
| $Ca^{47}$-Aktivität in 0,5 g Eischale | $\hat{=}$ | 27 060 Ipm |
| Gewicht der gesamten Eischale | = | 4,9532 g |
| $Ca^{47}$-Aktivität i. d. gesamten Eischale(£) | $\hat{=}$ | 268 068 Ipm |

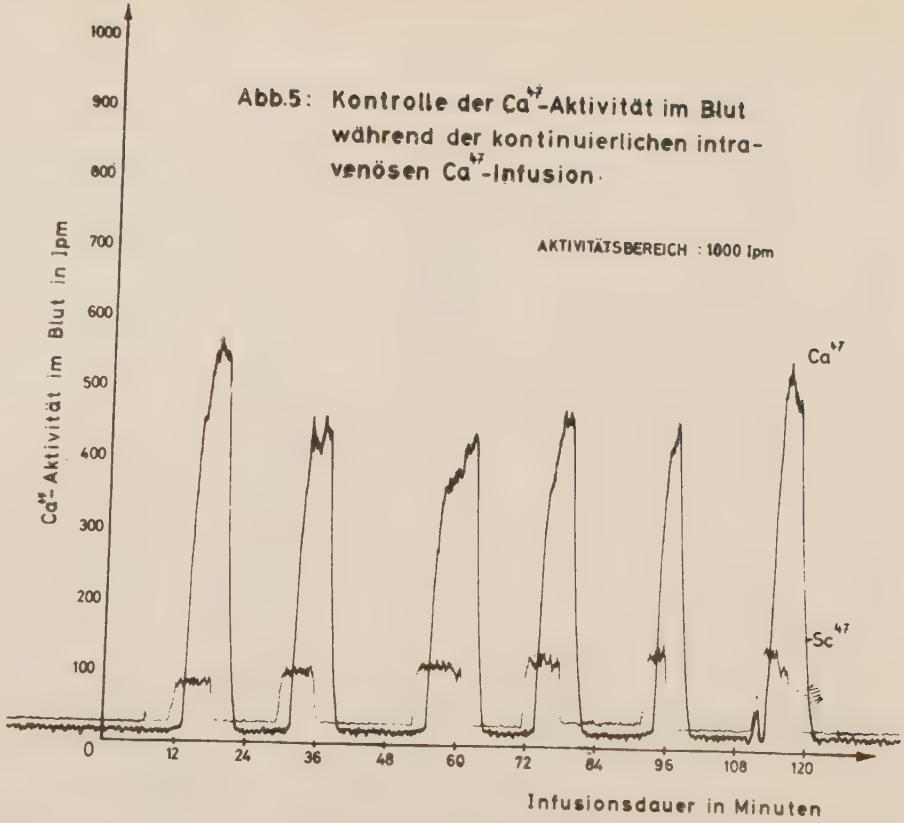


Abb.5: Kontrolle der $Ca^{47}$-Aktivität im Blut während der kontinuierlichen intravenösen $Ca^{47}$-Infusion.
AKTIVITÄTSBEREICH : 1000 Ipm
$Ca^{47}$-Aktivität im Blut in Ipm
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
$Ca^{47}$
$Sc^{47}$
12
24
36
48
60
72
84
96
108
120
Infusionsdauer in Minuten

Aufgrund der oben genannten Beziehung ergibt sich für Huhn Nr. 19 folgende $Ca^{47}$-Einbaurate (-Ei):

$$x = \frac{100\ \% \cdot E\ (Ipm)}{A_i\ (Ipm)} = \frac{26\ 806\ 800}{871\ 508}$$

$$= \underline{30{,}75\ \%}\ \text{der infundierten } Ca^{47}\text{-Dosis.}$$

Auf diese Weise wurden die $Ca^{47}$-Einbauraten in die Eischalen an insgesamt 6 Legehennen ermittelt. Sie sind zusammen mit den Angaben über die durchschnittliche Höhe der $Ca^{47}$-Aktivität der Blutproben in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2

$Ca^{47}$-Einbaurate in die teilmineralisierte Eischale bei konstant gehaltener $Ca^{47}$-Aktivität im Blut

| Versuchshuhn Nr. | durchschnittliche $Ca^{47}$-Aktivität von 5 Blutproben (Ipm/ml Plasma) | Eischalengewicht in g | $Ca^{47}$-Einbaurate (-Ei) in % der infundierten $Ca^{47}$-Aktivität |
|---|---|---|---|
| 8 | 746 ± 35 | 3,845 | 38,81 |
| 15 | 723 ± 54 | 3,072 | 27,16 |
| 18 | 715 ± 31 | 5,170 | 31,72 |
| 16 | 505 ± 20 | 3,529 | 38,33 |
| 10 | 439 ± 51 | 3,789 | 38,86 |
| 19 | 326 ± 34 | 4,953 | 30,76 |
| | | $\bar{x}$ | 34,27 |
| | | s | ± 5,05 |

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

Wit Tabelle 2 zeigt, betrug die $Ca^{47}$-Einbaurate in die teilmineralisierte Eischale bei 6 Legehennen durchschnittlich 34,27 ± 5,05 % der im Versuchszeitraum von 2 Stunden infundierten $Ca^{47}$-Aktivität.

### 3. Die $C^{14}$-Einbaurate in die teilmineralisierte Eischale bei konstant gehaltener $C^{14}$-Aktivität im Blut

Die Bestimmung der $C^{14}$-Einbaurate in die teilmineralisierte Eischale wurde ebenfalls bei konstant gehaltener $C^{14}$-Bicarbonataktivität im Blut während einer Versuchsdauer von 2 Stunden vorgenommen. Anhand einer als Beispiel dienenden Aufzeichnung des Schreibers des Scintillationsspektrometers (vgl. dazu Abb. 6) wird deutlich, daß die $C^{14}$-Exhalationsaktivität, die ein Maß für die $C^{14}$-Aktivität des Blutes darstellt, z. B. beim Huhn Nr. 14 durch kontinuierliche Infusion von $C^{14}$-markiertem Bicarbonat über den Versuchszeitraum von 2 Stunden nahezu konstant war. Die $C^{14}O_2$-Exhalationskurve steigt zunächst etwas an, um nach etwa einer halben Stunde horizontal zu verlaufen, wobei die Impulsrate geringfügig zwischen 2000 und 2500 Ipm schwankt.

Bei Versuchshuhn Nr. 14, dem während der Versuchsdauer alle 20-30 Minuten eine Blutprobe entnommen wurde, betrug z. B. die $C^{14}$-Aktivität in 4 Plasmaproben durchschnittlich 10 038 $\pm$ 613 Ipm.- Die Berechnung der $C^{14}$-Einbaurate (-Ei) erfolgte analog der Berechnung der $Ca^{47}$-Einbaurate (siehe oben).

In Tabelle 3 sind die an 6 Legehennen ermittelten $C^{14}$-Einbauraten (Ei) zusammengefaßt.

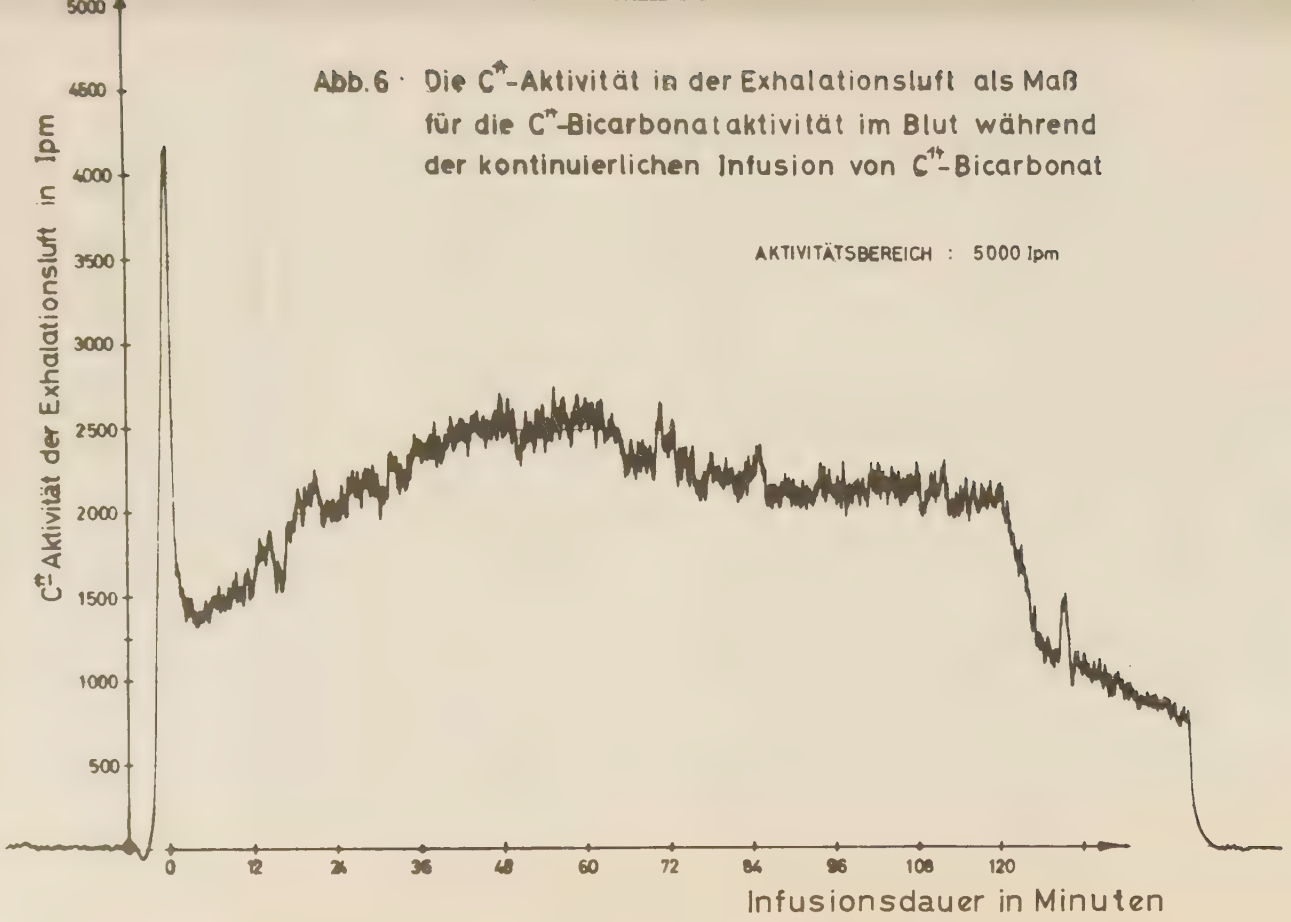



Abb. 6 · Die $C^{11}$-Aktivität in der Exhalationsluft als Maß für die $C^{11}$-Bicarbonataktivität im Blut während der kontinuierlichen Infusion von $C^{11}$-Bicarbonat

Tabelle 3

$C^{14}$-Einbaurate in die Eischale bei konstant gehaltener $C^{14}$-Aktivität im Blut

| Versuchshuhn Nr. | durchschnittliche $C^{14}$-Aktivität von 4 Blutproben (Ipm/ml Plasma) | Eischalengewicht in g | $C^{14}$-Einbaurate (Ei) in % der als Bicarbonat infundierten $C^{14}$-Aktivität |
|---|---|---|---|
| 4 | 11 778 ± 490 | 4,733 | 0,72 |
| 6 | 8 690 ± 557 | 4,292 | 0,97 |
| 7 | 6 844 ± 183 | 4,009 | 0,80 |
| 10 | 11 993 ± 478 | 3,713 | 1,64 |
| 14 | 10 038 ± 613 | 4,253 | 1,35 |
| 15 | 16 872 ± 824 | 2,114 | 3,63 |
| | | $\bar{x}$ | 1,51 |
| | | s | ± 1,08 |

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

Aus Tabelle 3 geht hervor, daß durchschnittlich 1,51 ± 1,08 % der im Versuchszeitraum von 2 Stunden als $C^{14}$-Bicarbonat infundierten $C^{14}$-Aktivität in die teilmineralisierte Eischale eingebaut wurden.

4. Die Einbauraten von $Ca^{47}$ und $C^{14}$ aus $C^{14}$-Bicarbonat in die Eischale bei konstant gehaltener Aktivität beider Nuklide im Blut (Doppelmarkierung)

Die $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Einbauraten in die teilmineralisierte Eischale wurden bei insgesamt 5 Legehennen nach 2-stündiger simultaner,

kontinuierlicher Infusion einer $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Bicarbonatlösung bestimmt. Durch alternierende Messung der $C^{14}O_2$-Exhalationsrate und der $Ca^{47}$-Aktivität des Vollblutes in Abständen von 15 Minuten wurde die Konstanz der Aktivität beider Nuklide im Blut überprüft.

Die durchschnittliche Höhe der $Ca^{47}$- bzw. $C^{14}$-Aktivität des Blutplasmas wird für die einzelnen Versuchshennen in Tabelle 4 angegeben. In dieser Tabelle sind auch die $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Einbauraten, die in den doppelt markierten Eischalen der 5 Versuchshennen ermittelt wurden, zusammen- und einander gegenübergestellt.

Wie den in Tabelle 4 zusammengestellten Daten zu entnehmen ist, wurden während einer 2-stündigen Versuchsdauer bei konstanter $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Aktivität im Blut durchschnittlich 39,02 $\pm$ 10,34 % der infundierten $Ca^{47}$-Aktivität und in der gleichen Zeit durchschnittlich 1,24 $\pm$ 0,42 % der als $C^{14}$-Bicarbonat infundierten $C^{14}$-Aktivität in die teilmineralisierten Eischalen eingebaut. Bezogen auf die applizierte Dosis verhalten sich demnach die in die Eischale eingelagerten Nuklide zueinander wie:

$$39{,}02 : 1{,}24 = 31 : 1$$

Wie dieses Verhältnis zu interpretieren ist, wird in der sich anschließenden Diskussion erörtert.

Tabelle 4

Einbauraten von $Ca^{47}$ und $C^{14}$ in die teilmineralisierte Eischale bei konstant gehaltener $Ca^{47}$- und $C^{14}$-Bicarbonat-Aktivität im Blut (Doppelmarkierung)

| Versuchs-huhn Nr. | durchschnittliche $Ca^{47}$-und $C^{14}$-Aktivität von 5 Blut-proben (Ipm/ml Plasma) | | Eischalengewicht in g | $Ca^{47}$-Einbaurate (-Ei) in % der infundierten $Ca^{47}$-Aktivität | $C^{14}$-Einbaurate (Ei) in % der infundier-ten $C^{14}$-Aktivität |
|---|---|---|---|---|---|
| | $Ca^{47}$ | $C^{14}$ | | | |
| 8 | 1 286 ± 47 | 10 270 ± 549 | 3,571 | 30,75 | 0,94 |
| 9 | 680 ± 31 | 8 031 ± 542 | 4,868 | 37,87 | 0,78 |
| 18 | 609 ± 47 | 10 389 ± 516 | 4,736 | 37,35 | 1,35 |
| 25 | 386 ± 16 | 15 900 ± 682 | 3,302 | 32,48 | 1,28 |
| 17 | 324 ± 23 | 12 731 ± 95 | 4,160 | 56,70 | 1,87 |
| | | | Mittelwerte | 39,02 | 1,24 |
| | | | Standardabweichung | ± 10,34 | ± 0,42 |

# VI. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das von mehreren Autoren (MONGIN und LACASSAGNE, 1966 a; HODGES, 1966) beobachtete Absinken des Blut-pH-Wertes während der Eischalenmineralisation auf den Entzug von Bicarbonationen aus dem Blut zurückzuführen ist. Diese sollen nach einer Theorie von GUTOWSKA und MITCHELL (1945) zur Bildung des Carbonatanteils der Eischale herangezogen werden.

In diesem Zusammenhang war auch zu prüfen, ob die in der Phase der Eischalenverkalkung festgestellte metabolische Acidose (MONGIN und LACASSAGNE, 1966 b) auf dem Wege einer gesteigerten Ventilation teilweise kompensiert wird.

## 1. Diskussion der in Abhängigkeit vom Funktionszustand der Schalendrüse ermittelten $C^{14}O_2$- und $CO_2$-Exhalationsraten

Nach intramuskulärer Injektion von $C^{14}$-markiertem Natriumbicarbonat (5 $\mu$Ci) wurden bei 9 Legehennen mit Hilfe des Exhalationsmeßgerätes FHT 50 A die innerhalb von 90 Minuten ausgeatmeten $C^{14}O_2$- bzw. $CO_2$-Mengen quantitativ erfaßt, und zwar bei jeder Henne in der Phase mit und ohne Eischalenverkalkung.

Die in Tabelle 1 zusammengefaßten Ergebnisse differieren signifikant in Abhängigkeit vom Funktionsstadium der Schalendrüse, wenn man sowohl die $C^{14}O_2$- als auch die $CO_2$-Exhalationsraten paarweise miteinander vergleicht. 8 von 9 Legehennen exhalierten in der Phase der intensivsten Mineralisation der Eischale (8. - 16. Std. nach Ablage des letzten Eis) mehr $C^{14}O_2$ bzw. mehr $CO_2$ als im Zeitraum ohne Eischalenverkalkung.

Dagegen war die Differenz der gemittelten $C^{14}O_2$- bzw. $CO_2$-Exhalationsraten in Höhe von 4,88 % der infundierten $C^{14}$-Dosis bzw. von 174 ml $CO_2$ statistisch nicht zu sichern, da deren Größe innerhalb der berechneten Standardabweichung lag. Dies bedeutet, daß die Unterschiede von Tier zu Tier bei einem Versuchsmaterial von nur 9 Hennen die von der Funktion der Schalendrüse abhängigen Differenzen überlagern. -

Die vorliegenden Ergebnisse sind mit den Befunden von MONGIN und LACASSAGNE (1966 b) gut in Einklang zu bringen. Die Autoren beobachteten bei Legehennen während der Eischalenmineralisation eine Erhöhung der Atemfrequenz von 7,2 auf 11,8 Atemzüge pro Minute, die, wie unsere Ergebnisse zeigen, tatsächlich mit einer vermehrten Abatmung von $CO_2$ einhergeht. In der Interpretation dieses Vorganges schließen wir uns der Meinung von MONGIN und LACASSAGNE an und betrachten die während der Eischalenmineralisation auftretende Hyperventilation als Folge einer metabolischen Acidose, die partiell kompensiert wird.

Uber die Entstehung dieser Acidose existieren jedoch verschiedene Ansichten: MONGIN und LACASSAGNE (1966 a) postulieren - entsprechend der Theorie von GUTOWSKA und MITCHELL (1945) - einen Entzug von Bicarbonationen aus dem Blut durch die Schalendrüse im Stadium der Eischalenverkalkung. Die Verminderung der Bicarbonationenkonzentration im Blut soll das Absinken des pH-Wertes bewirken.

Andererseits kann die Erniedrigung des pH-Wertes nach den im Literaturkapitel dargelegten Ansichten von SIMKISS (1961) und DIAMANTSTEIN (1966) durch die von der Kohlensäure bzw. von Bicarbonationen abgespaltenen Protonen verursacht werden, die möglicherweise aus den sekretorischen Zellen der Schalendrüse ins Blut diffundieren. Gemäß der HENDERSON-HASSELBALCH-GLEICHUNG führt eine Erhöhung der molaren Konzentration der $H^+$-Ionen zu einer Verminderung der molaren Konzentration der Bicarbonationen im Blut.

Das Säure-Basen-Gleichgewicht des Blutes kann sich also auch ohne den Entzug von Bicarbonationen verändern. -

Die von HODGES und LÖRCHER (1967) bei Legehennen gemessenen arteriovenösen $C^{14}$-Differenzen nach intravenöser Injektion von $C^{14}$-markiertem $NaHCO_3$ zeigten keine Abhängigkeit vom Funktionsstadium der Schalendrüse - ein Befund, der gegen einen Entzug von Bicarbonationen aus dem Blut zum Zwecke der Carbonatbildung in der Schalendrüse spricht. -

Um die Hypothese von GUTOWSKA und MITCHELL (1945) erneut und auf andere Weise zu prüfen, wurde bei 17 HNL-Legehennen die $C^{14}$-Einbaurate in die teilmineralisierte Eischale bei konstant gehaltener $C^{14}$-Bicarbonataktivität im Blut ermittelt und mit der ebenso bestimmten $Ca^{47}$-Einbaurate verglichen.

## 2. Diskussion der Einbauraten von $Ca^{47}$ und $C^{14}$ in die teilmineralisierte Eischale

### a. Zur Methodik

Die Frage, ob die Schalendrüse dem Blut während der Eischalenmineralisation Bicarbonationen entzieht oder nicht, wurde wie folgt zu klären versucht:
Da für die Bildung des $CaCO_3$ der Eischale äquimolare Mengen Calcium und Carbonat erforderlich sind und im Blut auch im Stadium der Eischalenverkalkung ein Gleichgewicht zwischen der Elimination und Zufuhr von Calcium bzw. Bicarbonat besteht, kann nach entsprechender radioaktiver Etikettierung der genannten Komponenten - mit $Ca^{47}$ bzw. $C^{14}$-Bicarbonat - deren Einbau in die teilmineralisierte Eischale quantitativ erfaßt werden.

Wird $Ca^{47}$ bzw. $C^{14}$-Bicarbonat einmalig intravenös verabreicht, so erfolgt die Elimination beider Nuklide mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Um die Calcium- bzw. Bicarbonatspiegel im Blut mit konstanter spezifischer Aktivität zu markieren, müssen folglich die genannten Nuklide kontinuierlich zugeführt werden und zwar pro Zeiteinheit in einer Menge, die der Eliminationsrate entspricht. Dies wurde zu erreichen versucht, indem eine $Ca^{47}$- und/oder $C^{14}$-Bicarbonat-Lösung mit Hilfe einer Dauerinfusionspumpe über einen Zeitraum von 2 Stunden kontinuierlich in die Flügelvene des Versuchshuhnes appliziert wurden.

Da das verabreichte $C^{14}$-markierte Bicarbonat - wie im Versuch I festgestellt wurde - größtenteils in Form des $C^{14}O_2$ exhaliert wird, erfolgte die Kontrolle der konstanten $C^{14}$-Aktivität im Blut durch kontinuierliche Messung der $C^{14}$-Aktivität der Ausatmungsluft. Die Überprüfung der Konstanz des $Ca^{47}$-Spiegels im Blut wurde hingegen durch mehrmalige Entnahme von Blutproben in Abständen von 15 - 20 Minuten während des laufenden Versuches ermöglicht.

Wie aus den Tabellen 2, 3 und 4 sowie den Abbildungen 5 und 6 hervorgeht, war die $Ca^{47}$- bzw. $C^{14}$-Bicarbonat-Aktivität im Blut - abgesehen von nur geringfügigen Schwankungen - hinreichend konstant.

b. Zu den Ergebnissen

In die teilmineralisierten Eischalen von jeweils 6 Legehennen wurden innerhalb von 2 Stunden durchschnittlich 34,27 $\pm$ 5,05 % (vgl. Tabelle 2) der infundierten $Ca^{47}$-Aktivität bzw. 1,51 $\pm$ 1,08 % der als $C^{14}$-Bicarbonat infundierten $C^{14}$-Dosis (vgl. Tabelle 3) eingebaut. In den doppelt markierten Eischalen, die bei 5 Legehennen nach 2-stündiger simultaner Infusion beider Nuklide untersucht wurden, konnten eine $Ca^{47}$-Einbaurate von durchschnittlich 39,02 $\pm$

10,34 % der infundierten $Ca^{47}$-Dosis und eine $C^{14}$-Einbaurate von durchschnittlich 1,24 $\pm$ 0,42 % der als $C^{14}$-Bicarbonat infundierten $C^{14}$-Aktivität ermittelt werden (vgl. Tab. 4). -

Nach der Theorie von GUTOWSKA und MITCHELL (siehe "Literatur" S. 4) wird zur Bildung des $CaCO_3$ in der Schalendrüse für ein Teil Calcium m i n d e s t e n s ein Teil Bicarbonat benötigt. Berücksichtigt man das Ca : Bicarbonat-Verhältnis im Hühnerblut von etwa

$$\frac{6 \text{ mMol Ca}}{30 \text{ mMol } HCO_3} = \frac{1}{5} \quad ,$$

so müßte - bei konstant gehaltener $Ca^{47}$- bzw. $C^{14}$-Bicarbonat-Aktivität im Blut - in der Eischale auf fünf Teile $Ca^{47}$ mindestens ein Teil $C^{14}$ entfallen - wenn die Bicarbonationen des Blutes für die Bildung des Carbonatanteils der Eischale herangezogen werden. - Wie aus den Tabellen 2, 3 und 4 hervorgeht, lagen die in den Eischalen gemessenen, in Prozent der infundierten Gesamtaktivität ausgedrückten Einbauraten von $Ca^{47}$ und $C^{14}$ durchschnittlich in einem Verhältnis von etwa 23 : 1 (vgl. Tab. 2 und 3) bzw. 31 : 1 (vgl. Tab. 4) vor.

Das ermittelte $Ca^{47}$ : $C^{14}$-Verhaltnis in der Eischale ist also um das 4- bis 6-fache weiter, als nach der Hypothese von GUTOWSKA und MITCHELL (1945) mindestens zu erwarten gewesen wäre. Dies bedeutet, daß ein direkter Entzug von Bicarbonationen aus dem Blut durch die Schalendrüse nicht in einer für die Carbonatbildung erforderlichen Menge erfolgt - die Hypothese von GUTOWSKA und MITCHELL als widerlegt gelten kann. -

Zu klären bleibt noch die Frage, wie die $C^{14}$-Aktivität von durchschnittlich 1,51 % (vgl. Tab. 3) bzw. 1,24 % (vgl. Tab. 4) der infundierten $C^{14}$-Dosis in die Eischale gelangt.
Es wird vermutet, daß $C^{14}O_2$, welches vom infundierten $C^{14}$-Bicarbonat stammt, aus dem Blut in die sekretorischen Zellen der Schalen-

drüse diffundiert und dort für die $C^{14}$-Bicarbonat- bzw. Carbonatbildung Verwendung findet. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, daß nach Verabreichung von $C^{14}$-markierter Glucose an Legehennen in der Eischale ebenfalls $C^{14}$-Aktivität vorgefunden wird (HODGES und LÖRCHER, 1967). Auch in diesem Falle ist vermutlich das durch den anaeroben und aeroben Abbau der $C^{14}$-Glucose entstehende $C^{14}O_2$ die Quelle für das $C^{14}$-markierte Carbonat der Eischale. Die $C^{14}$-Glucose wird als solche nicht in die Eischale eingelagert. - Das Stoffwechselendprodukt $CO_2$ diffundiert zwar in der Regel aufgrund eines $CO_2$-Partialdruckgefälles aus den Gewebszellen ins Blut, scheint jedoch in $HCO_3$-Ionen sekretierenden Organen, z. B. in den Speicheldrüsen des Rindes, der Katze und Maus (LEDER und TRITSCHLER, 1966) sowie in der Schalendrüse des Huhnes, den umgekehrten Weg einzuschlagen: Da unter Einfluß der Carboanhydratase in den sekretorischen Zellen der Schalendrüse laufend metabolisches $CO_2$ zu Kohlensäure hydratisiert und die durch Dissoziation der $H_2CO_3$ entstehenden Bicarbonationen permanent ins Uteruslumen sekretiert werden, könnte gegebenenfalls der $CO_2$-Partialdruck in diesen Zellen niedriger sein als im Blutplasma, so daß $CO_2$ bzw. $C^{14}O_2$ aus dem Blut in die Drüsenzellen des Uterus diffundiert. -

Nachdem sich die Theorie von GUTOWSKA und MITCHELL (1945) durch die vorliegenden experimentellen Befunde als nicht zutreffend herausgestellt hat, gewinnt somit die erstmalig von SIMKISS (1961) formulierte Ansicht, die später von DIAMANTSTEIN (1966) erweitert wurde, an Wahrscheinlichkeit - nämlich, daß aus metabolischem $CO_2$ und $H_2O$ unter Einfluß der Carboanhydratase in den Drüsenzellen des Uterus Bicarbonationen gebildet werden, die ins Uteruslumen sekretiert und nach Abspaltung eines Protons als Carbonat in die Eischale eingelagert werden. Diese Hypothese experimentell zu bestätigen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

An 9 HNL-Legehennen im Alter von 8 Monaten wurde das Ausmaß der pulmonalen Elimination von intramuskulär appliziertem $C^{14}$-markiertem Na-Bicarbonat sowie die $CO_2$-Exhalationsrate in Abhängigkeit vom Funktionsstadium der Schalendrüse bestimmt. -
Des weiteren wurden bei 17 HNL-Legehennen im Alter von 22 Monaten die $Ca^{47}$- und/oder $C^{14}$-Einbauraten in die teilmineralisierte Eischale bei konstant gehaltener $Ca^{47}$- und/oder $C^{14}$-Bicarbonat-Aktivität im Blut ermittelt. -

Die Versuche zeigten folgende Ergebnisse:

A. $C^{14}O_2$- und $CO_2$-Exhalationsraten

1. Legehennen, die kein Ei im Uterus hatten, exhalierten innerhalb von 90 Minuten post injectionem durchschnittlich 85,51 $\pm$ 5,64 % der als $C^{14}$-Bicarbonat intramuskulär applizierten $C^{14}$-Dosis. Im Stadium der intensivsten Eischalenmineralisation (8. - 16. Std. nach Ablage des letzten Eis) wurde dagegen bei den gleichen Versuchshennen eine $C^{14}$-Exhalationsrate von durchschnittlich 90,39 $\pm$ 6,21 % der verabreichten $C^{14}$-Dosis ermittelt.

   Die Paardifferenz zwischen den im Stadium mit und ohne Eischalenverkalkung bei jeder Henne ermittelten $C^{14}O_2$-Exhalationsraten konnte mit $p < 0,01$ statistisch gesichert werden.

2. Die im Versuchszeitraum von 90 Minuten exhalierte $CO_2$-Gesamtmenge betrug bei Legehennen in der Phase ohne Eischalenverkalkung durchschnittlich 1,839 $\pm$ 0,171 l, während die gleichen Hennen im Zeitraum intensiver Eischalenverkalkung durchschnittlich 2,013 $\pm$ 0,204 l $CO_2$ ausatmeten.

Der Vergleich der paarweise zusammengehörigen $CO_2$-Exhalationswerte der einzelnen Hennen ergab eine mit $p < 0,01$ signifikant vermehrte Abatmung von $CO_2$ während der Mineralisation der Eischale.

3. Die erhöhte $C^{14}O_2$- bzw. $CO_2$-Exhalation im Stadium intensiver Eischalenmineralisation ist als Folge einer metabolischen Acidose des Blutes zu betrachten, die durch forcierte Abatmung von $CO_2$ (Hyperventilation) partiell kompensiert wird.

B. Die Einbauraten von $Ca^{47}$ und $C^{14}$ in die Eischale

1. Bei konstant gehaltener $Ca^{47}$-Aktivität im Blut wurden im Zeitraum von 2 Stunden durchschnittlich 34,27 $\pm$ 5,05 % der infundierten $Ca^{47}$-Aktivität in die teilmineralisierte Eischale der Legehennen eingebaut.

   Zur Erzeugung eines konstanten $Ca^{47}$-Spiegels im Blut wurde eine $Ca^{47}$-Lösung mit einer Geschwindigkeit von 0,02 ml/Min. kontinuierlich i. v. infundiert.

2. Die bei konstant gehaltener $C^{14}$-Bicarbonataktivität im Blut nach 2-stündiger Versuchsdauer in den Eischalen der Legehennen vorgefundene $C^{14}$-Aktivität betrug durchschnittlich 1,51 $\pm$ 1,08 % der als $C^{14}$-Bicarbonat mit einer Geschwindigkeit von 0,075 ml/Min. kontinuierlich infundierten $C^{14}$-Dosis.

3. Nach simultaner, kontinuierlicher Infusion beider Nuklide und deren Konstanz im Blut wurden in den doppelt markierten Eischalen eine $Ca^{47}$-Einbaurate von durchschnittlich 39,02 $\pm$ 10,34 % der im Versuchszeitraum von 2 Stunden infundierten $Ca^{47}$-Aktivität sowie eine $C^{14}$-Einbaurate von durchschnittlich 1,24

± 0,42 % der als $C^{14}$-Bicarbonat innerhalb von 2 Stunden infundierten $C^{14}$-Dosis ermittelt.

4. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden dahingehend gedeutet, daß die Carbonatfraktion der Eischale - entgegen der Ansicht von GUTOWSKA und MITCHELL - nicht vom Bicarbonat des Blutes stammt.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

BENESCH, R., N.S. BARRON and C.A. MAWSON (1944):

Carbonic anhydrase, sulfonamides and shell formation in the domestic fowl.
Nature, London, 153, 138

COMMON, R.H. (1941):

The carbonic anhydrase activity of the hens oviduct.
J. agric. Sci., Lond., 31, 412 - 414

DAVENPORT, H.W. (1958):

The ABC of acid-base chemistry. 4. Auflg.
The university of Chicago Press.

DIAMANTSTEIN, T. (1966):

Uber die lokale Rolle der Carboanhydratase im Hinblick auf die Eischalenverkalkung.
Arch. f. Geflügelkde. 30, 309 - 320

DIAMANTSTEIN, T. und J. SCHLÜNS (1964):

Lokalisation und Bedeutung der Carboanhydratase im Uterus von Legehennen.
Acta histochem. 19, 296 - 302

DICULESCO, J. (1961):

Recherches histoenzymologiques sur l'oviducte de la poule.
Annales d'Histochemie 6, 187

GUTOWSKA, M.S. and C.A. MITCHELL (1945):

Carbonic anhydrase in the calcification of the egg shell.
Poult. Sci. 24, 159 - 168

GEIGY, J.R., A.G. (1960):

Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen.
6. Auflage, Basel

HÄUSLER, G. (1958):

Zur Technik und Spezifität des histochemischen Carboanhydratasennachweises im Modellversuch und in Gewebsschnitten von Rattennieren.
Z. Zellforsch., Abtlg. Histochem. 1, 29 - 47

HODGES, R.D. (1966 a):

Changes in blood $pO_2$ and pH during the formation of egg-shell in laying hens.
Proc. XIII th World Poult., Congr. Kiev. 314 - 319

HODGES, R.D. (1966 b):

The functional anatomy of the avian shell gland.
In HORTON-SMITH, C. and E.C. AMOROSO: Physiology of the domestic fowl, 191 - 198, Oliver and Boyd Limited, Edingurgh.

HODGES, R.D. and K. LÖRCHER (1967):

Possible sources of the carbonate fraction of egg shell calcium carbonate.
Nature 216, 609 - 610

LEDER, O. und P. TRITSCHLER (1966):

Nachweis höchster Carboanhydratase-Aktivitäten im Epithel der Speicheldrüsengänge.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 292, 229 - 238

MANN, T. and D. KEILIN (1940):

Sulphanilamide as a spezific inhibitor of carbonic anhydrase
Nature, London, 146, 164 - 172

McLEAN, F.C. and A.B. HASTINGS (1935):

The state of calcium in the fluids of the body. I. The conditions affecting the ionisation of calcium.
J. biol. Chem. 108, 283

MELDRUM, R.V. and F.J.W. ROUGHTON (1934):

Carbonic Anhydrase. Its Preparation and Properties.
J. Physiol. 80, 113

MONGIN, P. (1968):

Role of acid-base balance in the physiology of egg shell formation.
World's Poult. Sci. J. 24 (3) 200 - 230

MONGIN, P. et L. LACASSAGNE (1966 a):

Equilibre acido-basique du sang et formation de la coquille de l'oeuf.
Ann. Biol. anim. Bioch, Biophys. 6, 93 - 100

MONGIN, P. et L. LACASSAGNE (1966 b):

Rythme respiratoire et physiologie de la formation de la coquille de l'oeuf.
Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 6, 101 - 111

REIN, H. und M. SCHNEIDER (1955):

Einführung in die Physiologie des Menschen. 11. Auflg.
Springer Verlag Berlin - Göttingen- Heidelberg

ROMANOFF, A.L. and A. J. ROMANOFF (1949):

The Avian Egg. Wiley, New York

ROSSIER, P.H., A. BÜHLMANN und K. WIESINGER (1958):

Physiologie und Pathophysiologie der Atmung. 2. Auflg. Springer Verlag Berlin - Göttingen - Heidelberg

RUBIN, P.S. and J.E. HOWARD (1950):

Histochemical studies on rat, of acid mucopolysaccharides in calcificability and calcification. Metab. Interrel. 2, 155

SCHMIDT, W.J. (1962):

Liegt der Eischalenkalk der Vögel als submikroskopische Kristallite vor? Z. Zellforsch. 57, 848 - 880

SCHMIDT, W.J. (1966):

Das Verwachsen von Calcosphäriten bei der Schalenbildung des Vogeleis. Z. Morph. Ökol. Tiere 56, 252 - 258

SIMKISS, K. (1961):

Calcium metabolism and avian reproduction. Biol. Rev. 36, 321 - 367

SIMKISS, K. and C. TYLER (1957):

A histochemical study of the organic matrix of hen eggshell. Quart. J. micr. Sci. 98, 19

SOBEL, A.E. and M. BURGER (1954):

Calcification. XIV. Investigation of the role of chondroitin sulphate in the calcifying mechanism. Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 87, 7

STEWART, G.F. (1935):

The structure of the hens eggshell. Poult. Sci. 14, 24 - 32

WARREN, D.C. and H.M. SCOTT (1935):

The time factor in egg formation. Poult. Sci. 14, 195 - 207

WEBER, Erna (1961):

Grundriß der biologischen Statistik. 4. Auflg. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

WINNE, D. (1964):

Zur Auswertung von Versuchsergebnissen:
Die verteilungsfreien Rangteste von Wilcoxon.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 14, 119 - 121

Herrn Professor Dr. Kurt Bronsch gilt mein Dank für das überlassene Thema, die Gewährung uneingeschränkter Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut und für das stete Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Herrn Oberassistent Dr. Konrad Lörcher verdanke ich wissenschaftliche Anregungen und zahlreiche Ratschläge bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

Zu danken habe ich ferner den Direktoren und Mitarbeitern des Institutes für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Hochschule Hannover sowie der Institute für Veterinär-Biochemie und Physiologie der Freien Universität Berlin für die Mitbenutzung von Strahlenmeßgeräten und zuletzt, aber nicht am wenigsten, Frau Inge Grosser, die mir bei der Durchführung der Analysen stets hilfreich zur Seite stand.

# LEBENSLAUF

Am 26. September 1942 wurde ich als Sohn des Funkers Herbert Zscheile und seiner Frau Edith, geb. Schaefer, in Dresden geboren.

Nach achtjährigem Besuch der Grundschule kam ich 1957 in die Kreuzschule in Dresden und legte dort im Juni 1961 die Reifeprüfung ab.

Danach besuchte ich das Menzelgymnasium in Berlin-Tiergarten, wo ich im September 1962 die Anerkennungsprüfung zum Reifezeugnis der DDR bestand.

Im Wintersemester 1962/63 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Veterinärmedizin, das ich im Januar 1968 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit Januar 1968 bin ich am Institut für Tierzucht und Tierernährung der Freien Universität Berlin als wissenschaftlicher Mitarbeiter tätig.